



UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Ecole doctorale Physiologie et Physiopathologie

Centre de Recherche de Saint-Antoine

Equipe "Instabilité des Microsatellites et Cancer"

Mutation de la chaperonne HSP110 et cancers MSI :

Etude de ses conséquences moléculaires, fonctionnelles,
physiopathologiques et cliniques

Par Anaïs Lagrange

Thèse de doctorat de Génétique des Cancers

Dirigée par le Docteur Alex Duval

Présentée et soutenue publiquement le 15 décembre 2014

Devant un jury composé de :

Pr Florent SOUBRIER	Président
Dr Béatrice ROMAGNOLO	Rapporteur
Dr Pierre MARTINEAU	Rapporteur
Dr Carmen GARRIDO	Examineur
Pr Thierry ANDRÉ	Examineur
Dr Alex DUVAL	Directeur de thèse
Dr Ada COLLURA	Co-encadrante

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements au **Professeur Florent Soubrier** qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse. J'adresse également mes remerciements au **Docteur Béatrice Romagnolo** et au **Docteur Pierre Martineau** pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant de le rapporter, ainsi qu'au **Docteur Carmen Garrido** et au **Professeur Thierry André** pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie vivement le **Docteur Alex Duval** de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire il y a maintenant 6 ans. Alex, merci de m'avoir permis de travailler sur ce magnifique projet et de m'avoir fait confiance. Tu as joué un rôle important dans l'initiation de ma carrière de futur chercheur. Un grand merci pour tes précieux conseils, je t'en suis très reconnaissante. Peut-être qu'un jour nous aurons l'occasion de travailler à nouveau ensemble...

Je tiens également à remercier de tout cœur le **Docteur Ada Collura**. Ada, tu as été une excellente encadrante, se fût un réel plaisir de travailler avec toi sur ce projet. J'ai énormément appris en travaillant à tes côtés grâce à tes connaissances pratiques et scientifiques. Merci pour tes conseils, ta patience et tes encouragements. Tu as été d'un très grand soutien pendant des 4 années...

Je remercie également nos collaborateurs, le **Docteur Fabrice Lejeune** et le **Docteur Carmen Garrido**, pour leur contribution importante à ce projet de thèse.

J'aimerais remercier tout particulièrement les ingénieurs de l'équipe, **Kristell Wanherdrick** et **Olivier Buhard** qui ont également participé et contribué au bon déroulement de ce projet de thèse. J'ai réellement apprécié d'avoir travaillé avec vous. Merci pour l'aide que vous m'avez apporté, autant par vos compétences, que vos conseils, ainsi que votre expérience. Merci également pour tout ce que vous faites pour l'équipe en général !

Je remercie le service d'anatomo-pathologie, et en particulier le **Professeur Jean François Fléjou**, le **Docteur Magali Svreck** ainsi que la technicienne **Sylvie Dumont** pour nous avoir donné accès à de nombreux échantillons ainsi que pour leur aide technique.

Je tiens à remercier **A'dem Bokhari** qui va prendre le relais de ce superbe projet. Merci à toi, tu m'as permis d'obtenir les derniers résultats nécessaires à la soumission de l'article en réalisant des xénogreffes que je n'ai pu réaliser.

Je remercie également le **Docteur Richard Hamelin** qui m'a permis d'intégrer cette équipe en 2008. Richard, ce fût un plaisir d'avoir travaillé avec toi, tu m'as donné l'opportunité de travailler dans cette merveilleuse équipe, tu m'as mis sur le chemin...j'ai ensuite continué la route.

Je remercie enfin tous les autres membres de l'équipe MSI, le **Docteur Martine Muléris**, les étudiants, **Isabelle Sourouille**, **Sahra Bodo**, **Laetitia Marisa**, **Rénato Lupinacci** ainsi que **Marie-Annick Marry** pour sa précieuse aide au bon fonctionnement de nos manips, **Mouna Souissi** et **Marie-Pierre Belot**, avec qui j'ai été amené à travailler durant ces belles années de thèses. Merci également à un ancien membre de l'équipe...**Nizar El-Murr** !

RÉSUMÉ

Les cancers MSI (pour Microsatellite Instable) sont caractérisés par un niveau élevé d'instabilité de la molécule d'ADN qui affecte en priorité les séquences répétées appelées microsatellites (répétitions en tandem de 1 à 5 nucléotides), consécutivement à l'inactivation du système de réparation des erreurs de réplication de l'ADN dans les cellules tumorales (système MMR, pour Mismatch Repair). Ces cancers peuvent être héréditaires ou de survenue sporadique, les localisations primaires les plus fréquentes étant le côlon, l'endomètre et l'estomac. Depuis la mise en évidence de ce phénotype tumoral (1993), l'étude de la carcinogenèse MSI a révélé les mutations somatiques de nombreux gènes au niveau des microsatellites localisés dans leur séquence codante. Les altérations de ces gènes (délétion/insertion de 1 à 2 pb) décalent leur cadre de lecture. Les allèles mutés codent en conséquence pour des protéines tronquées dont la fonction est le plus souvent perdue. Ces altérations affectent différents gènes suppresseurs de tumeurs ou apparentés agissant au niveau de voies de signalisation et processus en rapport avec l'oncogenèse. Leurs altérations sont sélectionnées dans les cancers MSI lorsqu'elles promeuvent le développement tumoral.

Les travaux présentés dans le cadre de mon doctorat font état de la découverte de la première mutation d'une chaperonne dans une pathologie tumorale. Il s'agit de l'oncogène codant la chaperonne HSP110 (HSP, pour Heat Shock Protein). Cette mutation affecte un microsatellite non-codant intronique localisé dans un site accepteur d'épissage. Mes travaux décrivent en rapport les conséquences moléculaires, fonctionnelles, physiopathologiques et cliniques de cette altération dans les cancers colorectaux. Brièvement, je montre comment la survenue de cette mutation conduisant à un saut d'exon est inéluctable et bi-allélique dans l'ADN tumoral, et par quels mécanismes elle entraîne la perte des activités oncogéniques d'HSP110 dans les cellules cancéreuses (effet pro-apoptotique et chimio-sensibilisant, effet antiprolifératif et de ralentissement de la croissance tumorale). Ces résultats remettent en question les mécanismes qui sous-tendent l'oncogenèse MSI et le caractère oncogénique de l'instabilité microsatellitaire par elle-même. Sur un plan physiopathologique et clinique,

ils permettent en particulier de pointer HSP110 comme une cible pronostique (facteur prédictif de réponse à la chimiothérapie) et thérapeutique. Je propose une approche de traitement inédite et personnalisée pour les patients avec une tumeur MSI, visant à exacerber le caractère délétère de la mutation d'*HSP110* dans les cellules tumorales.

ABSTRACT

MSI cancers (MicroSatellite Instability) are characterized by widespread instability of DNA repeated sequences, known as microsatellites, due to DNA mismatch repair system (MMR) deficiency in tumor cells. MSI was first observed in inherited tumors associated with Lynch syndrome and later in sporadic colon, gastric and endometrial cancers. Since the detection of this tumor phenotype (1993), most of the oncogenic events reported in these tumors are somatic mutations (1 or 2 bp insertions or deletions) that affect coding DNA repeats, resulting in frameshifts and inactivation of the corresponding proteins. They accumulate in tumor cells due to positive selection during the MSI-driven tumorigenic process when they promote tumor development by inactivating genes with tumor suppressor-related functions.

As part of my thesis, this work reports the first somatic mutation of a chaperone protein in a cancer so far, *i.e.* HSP110 (Heat Shock Protein) in MSI colorectal cancer. This mutational event consists in the somatic deletion of the intronic T17 microsatellite, located in the splice acceptor site of *HSP110* exon 9. During my thesis, I investigated the molecular, functional, pathophysiological and clinical consequences that are related to the occurring of this alteration in MSI colon tumors. In brief, we demonstrate that it is almost systematic and bi-allelic in these cancers, leading to exon 9 skipping and inactivation of the oncogenic functions of the HSP110 chaperone (pro-apoptotic and anti-proliferative impact leading to chemosensitization of tumor cells and tumor growth decrease). Basically, our findings support an unexpected and paradoxical anticancer impact of the microsatellite instability-driven pathway in mismatch repair-deficient colon cancer. From a pathophysiological and clinical point of view, they highlight HSP110 as a putative relevant prognostic marker (improvement of patients' response to chemotherapy) and therapeutic target. According to these findings, I propose in this work a therapeutic strategy targeting *HSP110* and its mutant for personalized medicine of MSI colon cancer patients.

TABLE DES MATIERES

ABRÉVIATIONS.....	11
AVANT PROPOS	13
INTRODUCTION.....	15
PARTIE I : LES CANCERS COLORECTAUX MSI	17
I) GENERALITES SUR LES CANCERS COLORECTAUX	17
II) ONCOGENESE MSI	21
1. Le phénotype tumoral MSI	21
2. Le système MMR	22
a. Le fonctionnement du système MMR.....	22
b. La déficience du système MMR, responsable de l'oncogenèse MSI	24
3. Les cancers MSI héréditaires : syndrome de Lynch ou HNPCC	25
4. Les cancers MSI sporadiques	27
5. Caractéristiques cliniques des tumeurs MSI et méthodes diagnostiques	28
a. Caractéristiques cliniques et pronostiques	28
b. Marqueurs pronostiques	28
c. Méthodes diagnostiques.....	30
6. Réponse aux traitements de chimiothérapie.....	34
a. Le 5-Fluorouracil (5-FU)	35
b. Le protocole FOLFOX	36
III) NOTION DE GENES CIBLES DE L'INSTABILITE MICROSATELLITAIRE	39
1. Mutation de microsatellites présents dans la région codante des gènes.....	41
2. Mutation de microsatellites présents dans la région non codante	45
a. Répétition intronique située dans un site « atténuateur » de la transcription: l'oncogène <i>MYB</i>	46
b. Répétition intronique située à proximité d'un site accepteur d'épissage : <i>MRE11</i> et <i>ATM</i>	46
c. Répétitions introniques dans les régions 3'et 5' UTR.....	46
PARTIE II : NMD ET CANCERS	48
I) ROLE DU NMD :	48
1. Facteurs requis pour l'activité du NMD	49
a. Les protéines UPF : le corps de la machinerie NMD	50
b. Les protéines SMG : médiateurs du cycle de phosphorylation de UPF1	51
c. Les facteurs EJC	51
2. Mécanismes moléculaires du NMD	52
a. Étape 1 : Détection.....	52
b. Étape 2 : Marquage de l'ARNm contenant un PTC	52
c. Étape 3 : Destruction de l'ARNm à PTC	53
d. Étape 4 : Evénements post-destruction de l'ARNm.....	53
II) NMD ET CARCINOGENESE	55
a. NMD et sa nature <i>Jekyll and Hyde</i>	55
b. NMD et carcinogenèse MSI	58

PARTIE III : LES PROTEINES HSP	60
I) PROTEINES CHAPERONNES ET CANCER.....	63
1. Rôle des protéines HSP dans les cancers	63
2. Protéines HSP dans les cancers colorectaux.....	66
3. Thérapie : des inhibiteurs de chaperonne	68
II) LA PROTEINE CHAPERONNE HSP110	70
1. Structure de la protéine HSP110	70
2. Rôle de la protéine HSP110	71
3. HSP110 et cancers	73
RESULTATS.....	75
VUE SYNOPTIQUE DES TRAVAUX DE RECHERCHE	77
ARTICLE 1	85
EXPRESSION OF A MUTANT HSP110 SENSITIZES COLORECTAL CANCER CELLS TO CHEMOTHERAPY AND IMPROVES DISEASE PROGNOSIS.	
ARTICLE 2	95
PATIENTS WITH COLORECTAL TUMORS WITH MICROSATELLITE INSTABILITY AND LARGE DELETIONS IN HSP110 T ₁₇ HAVE IMPROVED RESPONSE TO 5-FLUOROURACIL-BASED CHEMOTHERAPY.	
ARTICLE 3	109
MUTATION OF HSP110 INHIBITING TUMOR GROWTH THROUGH A STAT3/NMD DRUGGABLE PATHWAY IN MISMATCH REPAIR DEFICIENT COLORECTAL CANCER.	
ARTICLE 4.....	137
HSP110 T ₁₇ , A NEXT GENERATION MARKER FOR THE DETECTION OF MICROSATELLITE INSTABILITY IN COLORECTAL CANCER.....	
EDITORIAL 1	161
MICROSATELLITE INSTABILITY IN COLORECTAL CANCER : TIME TO STOP HIDING !	
EDITORIAL 2	165
MUTATION D'HSP110 DANS LES CANCERS COLORECTAUX. LE PARADOXE DU CHAPERON QUI NE PROTEGE PLUS.	
DISCUSSIONS & PERSPECTIVES.....	173
CONCLUSION GENERALE	185
BIBLIOGRAPHIE	189
ANNEXE	207

TABLES DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Classification des CCR en stade.....	6
Figure 2 : Distribution des différents types de cancers colorectaux.	8
Figure 3 : Le système de réparation des mésappariements de bases (MMR) chez l'homme.	12
Figure 4 : Marqueurs pronostiques de MSI.	19
Figure 5 : Mise en évidence du phénotype MSI.	22
Figure 6 : Modèle génétique multi-étape de la carcinogenèse colorectale.	28
Figure 7 : L'oncogenèse MSI.....	29
Figure 8 : Fréquences de mutations des gènes cibles de l'oncogenèse colorectale MSI.	33
Figure 9 : Mécanisme moléculaire du NMD.	42
Figure 10 : Impact du NMD sur l'oncogenèse.	45
Figure 11 : Rôle des protéines HSP dans la cellule normale.....	50
Figure 12 : Surexpression des HSP dans les cancers.....	51
Figure 13 : Représentation schématique d'HSP90, HSP70 et HSP27. Sites de fixation des inhibiteurs.	56
Figure 14 : Structure d'HSP110 et HSP70 et leur interaction	58
Figure 15 : Proposition de modèle pour la voie CD1d dans l'épithélium intestinal.	60

TABLES

Table 1 : Classification TNM des tumeurs.	7
Table 2 : Homologies des gènes MMR chez <i>E. coli</i> , <i>S. Cerevisiae</i> et <i>H. Sapiens</i>	12
Table 3 : Critères d'Amsterdam révisés (II).....	15
Table 4 : Critères de Bethesda.....	16
Table 5 : Liste des gènes cibles mutés dans les cancers MSI les plus fréquemment cités dans la littérature.	31
Table 6 : Protéines composants la machinerie du NMD.....	37
Table 7 : Liste des différentes familles de protéines HSP.....	49

ABRÉVIATIONS

#

17-AAG : 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin
5-FdUTP : fluorodesoxyuridine triphosphate
5-FU : 5-Fluorouracil

A

ADCC : antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
ADN : acide désoxyribonucléique
APAF-1 : apoptosis protease activating factor 1
AMM : autorisation de mise sur le marché
ARN : acide ribonucléique
ASK1 : apoptosis signal regulating kinase 1
ATP : adénosine triphosphate

B

BER : base excision repair

C

CBC : cap-binding complex
CBP : cap-binding protein
CCR : cancer colorectal
CD1d : cluster of differentiation 1d
CIMP : CpG island methylator phenotype
CIN : chromosomal instability
CPA : cellule présentatrice d'antigène
C-Ter : C-terminale

D

DECID : decay-inducing
DFS : disease-free survival
DPD : dihydropyrimidine dehydrogenase
dTMP : desoxy-thymidine monophosphate
dTTP : desoxy-thymidine triphosphate
dUMP : desoxy-uridine monophosphate
dUTP : desoxy- uridine triphosphate

E

EGFR : epidermal growth factor receptor
eIF : eukaryotic translation initiation factor
EJC : exon-junction complex
eRF : eukaryotic release factor

F

FAP : familial adenomatous polyposis
FDA : food and drug administration
FOLFIRI : folinique acid, 5-fluorouracil,, irinotecan
FOLFOX : folinique acid, 5-fluorouracil, oxaliplatine
FRET : fluorescence resonance energy transfert

G

GINI : gene identification by NMD inhibition

H

HDGC : hereditary diffus gastric cancer
HIF1 α : hypoxia inducible factor-1 α
HNPCC : hereditary non polyposis colorectal cancer
HRG β 1 : héréguline- β 1
HSE : heat shock element
HSF1 : heat shock transcription factor 1
HSP : heat shock protein

I

IDL : insertion deletion loop

K

KO : knock-out
KI : knock-in

L

LOH : lost of heterozygosity

M

MLH : MutL homolog
MMR : mismatch repair
MRN : MRE11-RAD50-NBS1
MSH : MutS homolog
MSI : microsatellite instable
MSS : microsatellite stable

N

NBD : nucleotide binding protein
NEF : nucleotide exchange factor
NER : nucleotide excision repair
NGD : no-go decay
NHL : lymphome non-Hodgkinien
NMD : nonsense mediated mRNA decay
NOS : nitric oxide synthase
NSD : non-stop decay
N-Ter : N-Terminal

P

PCNA : proliferating cell nuclear antigen
PCR : polymerase chain reaction
PMS : postmeiotic segregation
increased
PP2A : proteine phosphatase 2A
PTC : premature termination codon

R

RER : replication errors
RT : reverse transcription

S

SBD : substrate binding protein
si-RNA : small interfering ribonucleic acid
SMG : suppressor with morphogenetic defects on genitalia
SURF : SMG1, UPF1, eRF

T

TNFR1 : tumor necrosis factor receptor
1
TNM : tumor node metastasis
TS : thymidylate synthase

U

UPF : upstream factor
UTR : untranslated region

V

VEGF : vascular endothelial growth factor

AVANT PROPOS

Les cancers MSI (pour Microsatellite Instable) sont caractérisés par un niveau élevé d'instabilité de la molécule d'ADN qui affecte en priorité les séquences répétées appelées microsatellites (répétitions en tandem de 1 à 5 nucléotides), consécutivement à l'inactivation du système de réparation des erreurs de réplication de l'ADN dans les cellules tumorales (système MMR, pour Mismatch Repair). Ces cancers peuvent être héréditaires ou de survenue sporadique, les localisations primaires les plus fréquentes étant le côlon, l'endomètre et l'estomac. Depuis la mise en évidence de ce phénotype tumoral (1993), l'étude de la carcinogenèse MSI a révélé les mutations somatiques de nombreux gènes au niveau des microsatellites localisés dans leur séquence codante. Les altérations de ces gènes (délétion/insertion de 1 à 2 pb) décalent leur cadre de lecture. Les allèles mutés codent en conséquence pour des protéines tronquées dont la fonction est le plus souvent perdue. Ces altérations affectent différents gènes suppresseurs de tumeurs ou apparentés agissant au niveau de voies de signalisation et processus en rapport avec l'oncogenèse. Leurs altérations sont sélectionnées dans les cancers MSI lorsqu'elles promeuvent le développement tumoral.

De manière originale, les travaux présentés dans le cadre de mon doctorat font état de la découverte de la première mutation d'une chaperonne dans une pathologie tumorale. Il s'agit de l'oncogène codant la chaperonne HSP110 (HSP, pour Heat Shock Protein) dont nous avons pu identifier qu'il était muté au niveau d'une répétition microsatellite non-codante de l'ADN (mutation d'épissage en rapport avec l'instabilité d'un microsatellite intronique dans un site accepteur). Mes travaux indiquent que la mutation d'HSP110 semble avoir un impact délétère pour les cellules tumorales (effet pro-apoptotique et chimiosensibilisant, effet antiprolifératif et de ralentissement de la croissance tumorale). Ils suggèrent que le statut d'HSP110 pourrait constituer un facteur prédictif de réponse à la chimiothérapie chez les patients. La proposition d'une approche visant à induire l'expression du mutant HSP110 (effet dominant négatif) est également avancée à visée thérapeutique. Enfin, l'intérêt de cette mutation en tant qu'évènement marqueur à visée diagnostique du phénotype tumoral MSI est aussi mis en avant.

L'ensemble de ces travaux est présenté dans ce document sous forme de 4 articles originaux. Leur exposé est précédé d'une revue de la littérature nécessaire à leur compréhension. La première partie de cette revue porte sur le système MMR et décrit les principales caractéristiques génétiques somatiques qui découlent du processus d'instabilité microsatellitaire dans l'ADN tumoral, ainsi que les principales caractéristiques cliniques de ces cancers. Une deuxième partie décrit le NMD (NMD, pour Nonsense mediated mRNA Decay) et son rôle dans la tumorigenèse MSI puisque ce système de maintenance de la transcription joue un rôle de censure pour l'expression des nombreux mutants générés du fait de l'instabilité microsatellitaire dans les cellules tumorales, incluant le mutant HSP110. Enfin, je termine cette revue en présentant les principales protéines chaperonnes et leur rôle dans l'oncogenèse, focalisant mon point de vue sur HSP110 et ce qui est connu de son rôle dans la carcinogenèse, en particulier colorectale.

INTRODUCTION

Partie I : LES CANCERS COLORECTAUX MSI

I) Généralités sur les cancers colorectaux

En 2011, les cancers colorectaux (CCR) se situent au troisième rang des cancers par ordre de fréquence et touchent plus de 40 000 nouveaux cas chaque année en France (Institut national du cancer, janvier 2012). La prévalence élevée des CCR et sa gravité (17 000 décès par an) en font un véritable enjeu de santé publique.

Les cancers colorectaux sont des cancers qui affectent les épithéliums du côlon et du rectum. Dans la majorité des cas, le CCR provient d'un polype adénomateux dégénéré, un bourgeonnement non cancéreux au début présentant une organisation aberrante. Le cancer va ensuite infiltrer les différentes couches du côlon ou du rectum et diffuser dans les ganglions lymphatiques dans un premier temps, puis à distance (foie, poumon, péritoine). Les adénocarcinomes sont caractérisés par leur agressivité et leur capacité à essaimer sous forme de métastases ^{1, 2}. Une classification histo-pronostique a été proposée, la classification TNM (T : envahissement tumoral, N : envahissement ganglionnaire, M : dissémination métastatique) ³. Les CCR sont répartis en 4 stades allant de I à IV. Schématiquement, les stades I et II sont caractérisés par un envahissement de la paroi intestinale allant de la sous-muqueuse à la totalité de la paroi; les stades III par un envahissement de la paroi avec un envahissement ganglionnaire métastatique ; les stades IV par la présence d'une dissémination métastatique à distance (**Figure 1 ; Table 1**).

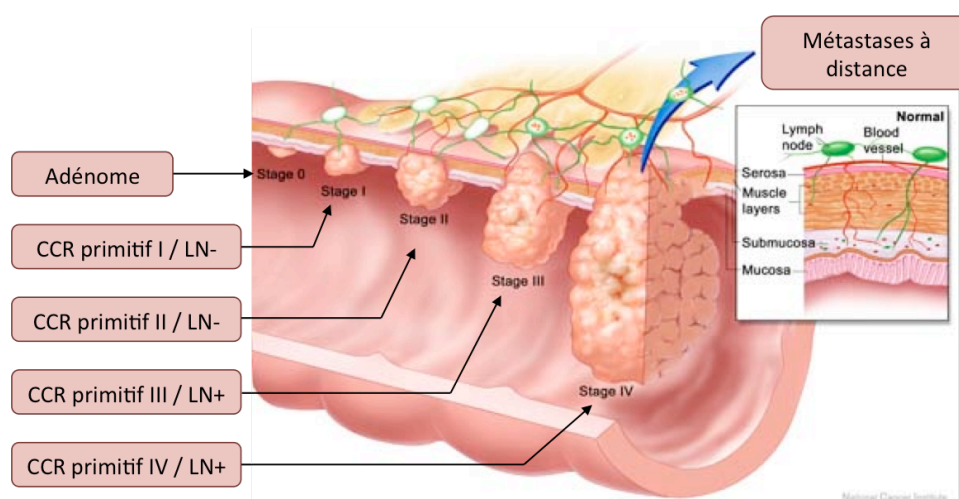


Figure 1 : Classification des CCR en stades.
LN: envahissement ganglionnaire

Groupe selon la classification TNM			
STADE	STADE T	STADE N	STADE M
I	T1 ou T2	N0	M0
IIa	T3	N0	M0
IIb	T4	N0	M0
IIIa	T1 ou T2	N1	M0
IIIb	T3 ou T4	N1	M0
IIIc	Tx	N2	M0
IV	Tx	Nx	M1

Table 1 : Classification TNM des tumeurs.

T: envahissement tumoral; N: envahissement ganglionnaire; M: dissémination métastatique.

T1: tumeur envahissant la muqueuse ou la sous muqueuse, T2: tumeur envahissant la couche musculieuse externe sans la dépasser, T3: tumeur envahissant les tissus non pariétaux péri-coliques ou péri-anaux, T4: tumeur envahissant les tissus voisins, Tx: quel que soit le stade T.

N0: aucun envahissement ganglionnaire, N1: envahissement de 1 à 3 ganglions, N2: envahissement de 4 ganglions et plus, Nx: quel que soit le stade N.

M0: aucune métastase à distance, M1: présence de métastase(s) à distance.

De multiples événements génétiques (mutations) sont nécessaires à la cellule tumorale pour permettre ce modèle de progression multi-étapes. L'instabilité génomique est maintenant reconnue comme un critère essentiel pour l'acquisition de telles mutations dont la sélection est ensuite observée si elles confèrent aux cellules tumorales dans lesquelles elles surviennent, un avantage sélectif. Dans les CCR, il existe 2 types distincts d'instabilité génomique (**Figure 2**):

- L'instabilité chromosomique (CIN, pour Chromosomal Instability)
- L'instabilité des microsatellites (MSI, pour Microsatellite Instability)

La majorité des tumeurs (80-85% des cas) présente une instabilité chromosomique, elles sont appelées CIN ou LOH (pour Loss Of Heterozygosity) ⁴. Elles ont un contenu en ADN anormal (hypodiploïdie, le plus souvent hyperdiploïdie) et présentent des pertes et des gains de fragments chromosomiques. Elles présentent le plus souvent des mutations dans les gènes *TP53*, *APC* et *KRAS*. Elles sont exemptes d'instabilité des microsatellites, et sont encore appelées MSS (pour Microsatellite Stable).

Dans 10 à 15% des cas, les CCR ont un phénotype MSI. Ces tumeurs sont caractérisées par une déficience du système de réparation des mésappariements de base (MMR pour

MisMatch Repair), ce qui induit une instabilité génétique, le plus souvent au niveau de séquences nucléotidiques répétées, les microsatellites. Ces séquences sont distribuées dans tout le génome et représentent 3% des séquences génomiques environ. De part leur nature, ces séquences sont des points chauds de mutation lors de la réplication. En effet, l'ADN polymérase « dérape » (phénomène dit de *slippage*) sur ces séquences, ce qui aboutit à des mutations par insertion/délétion des motifs répétés.

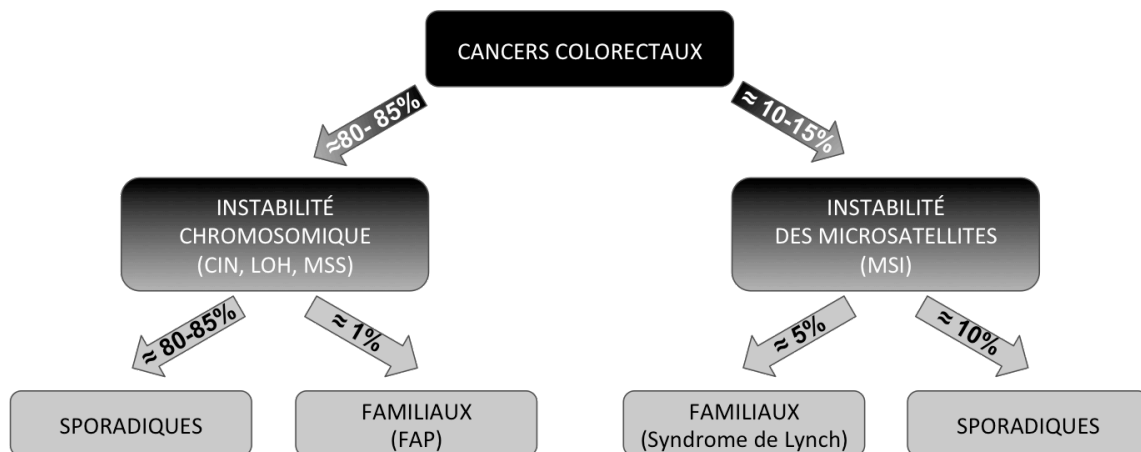


Figure 2 : Distribution des différents types de cancers colorectaux.

CIN: Chromosomal Instability; LOH: Loss Of Heterozygosity; MSS: MicroSatellite Stable; MSI: MicroSatellite Instable; FAP: Familial Adenomatous Polyposis.

Des modifications épigénétiques ont également été rapportées dans les cancers colorectaux ; on parle même du phénotype CIMP (pour CpG Island Methylator Phenotype) de certaines tumeurs, caractérisé par l'hyperméthylation de nombreux îlots CpG, et entraînant en particulier l'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* ⁵. De fait, la plupart des tumeurs MSI sporadiques sont de phénotype CIMP (méthylation du gène *MLH1*, voir ci-dessous). Les aspects relatifs à l'épigénétique des CCR ne seront pas développés dans cette introduction ⁶.

Les principales voies de signalisation impliquées dans la transformation maligne des cellules épithéliales coliques sont en partie partagées entre les 2 types tumoraux MSI et MSS. Par exemple, l'activation de la voie de signalisation *Wnt* résulte majoritairement de l'inactivation du gène *APC* dans les tumeurs CIN alors que dans les tumeurs MSI, on observe plutôt des mutations activatrices de la β -caténine, ou inactivatrice de l'AXIN2 (qui joue un rôle dans le complexe de dégradation de la β -caténine), ou encore des altérations de l'effecteur princeps de cette voie de signalisation, le facteur de transcription TCF-4 ^{4,7}.

L'inactivation de la voie du TGF β est également observée dans les deux types de tumeurs, découlant de mutations des gènes *SMAD4* et *SMAD2* (régulateurs de l'expression des gènes cibles de TGF β) dans les cancers de phénotype CIN, ou de mutations affectant le gène du récepteur de type 2 au TGF β dans les tumeurs MSI (TGFB2) ^{4,7,8}. La voie RAS-MAP kinase est activée alternativement par des mutations du gène *KRAS* dans les tumeurs CIN alors que c'est plus souvent la mutation de *BRAF* qui est observée dans les tumeurs MSI ⁷. La protéine p53 est souvent mutée dans les tumeurs CIN alors que d'autres mutations peuvent affecter des processus en rapport dans les CCR MSI, *e.g.* altération de gènes impliqués dans l'apoptose comme *BAX* ou *CASP5* par exemple ^{4, 8}. Néanmoins, beaucoup d'autres altérations ou processus sont spécifiques à un type tumoral ou un autre. Dans ce rapport, je focaliserai mon attention à la description des mutations somatiques générées du fait de MSI dans les CCR MMR-déficients et au rôle supposé de ce processus dans l'oncogenèse, en particulier colique.

II) Oncogenèse MSI

1. Le phénotype tumoral MSI

La notion d'instabilité nucléotidique de l'ADN dans les cancers humains fut abordée pour la première fois par le groupe de Manuel Perucho lors d'un congrès international sur les oncogènes, en avril 1992. Après divers refus de journaux prestigieux, probablement dus à la grande nouveauté des faits décrits, ce n'est qu'en juin 1993 que son groupe publie un article dans la revue *Nature* décrivant des « mutations somatiques ubiquitaires de séquences répétées dans les cancers colorectaux », révélant ainsi un nouveau mécanisme de carcinogenèse colique ⁹.

En 1993 également, dans la revue *Science*, deux équipes rapportent par ailleurs ce mécanisme d'instabilité des microsatellites aussi bien dans des cancers colorectaux héréditaires (HNPCC pour Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer) que sporadiques ^{10, 11}.

Un premier locus génétique prédisposant aux syndrome de Lynch a ainsi pu être localisé sur le chromosome 2 ¹², puis un second sur le chromosome 3 ¹³. Le phénomène d'instabilité microsatellitaire de ces tumeurs évoque les conséquences d'un défaut du système MutHLS chez *Escherichia Coli*, impliqué dans la surveillance de la fidélité de réplication de l'ADN. Peu après, il a été montré que les homologues humains des gènes du système mutHLS de *E. Coli* étaient localisés sur les chromosomes 2 (gène *MSH2*) et 3 (gène *MLH1*), et qu'ils étaient mutés de façon constitutionnelle chez les patients Lynch ^{14, 15, 16, 17}. Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans le système MMR. La conséquence d'une déficience de ce système de réparation dans les tumeurs est l'accumulation de nombreuses délétions et insertions au niveau des microsatellites. Ce phénotype tumoral fût dans un premier temps appelé RER (pour Replication Errors) et est appelé maintenant MSI, aussi bien dans le cas de cancers héréditaires que sporadiques.

2. Le système MMR

a. Le fonctionnement du système MMR

La fidélité de la réplication de l'ADN est en grande partie assurée par l'ADN polymérase. Cette enzyme peut faire des erreurs en introduisant sur sa copie un nucléotide erroné. Elle ne commet en moyenne qu'une erreur pour 10^5 bases appariées (10^{-5}). De plus, l'ADN polymérase a une capacité de relecture et de correction grâce à son activité 3'-5' exonucléase ; tenant compte de ce phénomène, le taux d'erreur est de 10^{-7} . Les erreurs qui persistent à cette autocorrection sont reconnues et réparées par le système MMR. Le taux d'erreur chute alors à un taux de $10^{-9/-10}$.

Le système MMR est un système très conservé de la bactérie aux mammifères, impliquant un certain nombre de protéines qui vont reconnaître et réparer directement les erreurs de mésappariements (incorporation du mauvais nucléotide) et des boucles formées à la suite d'insertions/délétions (IDL pour InInsIrtion/DeLetion Loop), permettant ainsi le maintien de la fidélité de réplication de l'ADN. Les composants du MMR reconnaissent également les bases modifiées causées par les agents alkylants, comme les drogues à bases de platine utilisés notamment comme agents anti-cancéreux ¹⁸.

Chez les bactéries il est composé de trois protéines principales, MutS, MutL et MutH, dont il tire son nom, système MTHLS (**Table 2**) ¹⁹. Chez les mammifères, il existe 5 homologues de MutS (de MSH2 à MSH6, pour MutS Homologue), 4 homologues de MutL (MLH1 et MLH3 pour MutL Homologue ; PMS1 et PMS2 pour Post-Meiotic Segregation), tandis que MutH n'a pas d'homologue connu (**Table 2**) ²⁰. Quand une erreur est détectée, la protéine MSH2 est capable de former des hétérodimères avec la protéine MSH6 ou MSH3, pour former respectivement les complexes MutS α ou MutS β (**Figure 3**). Les mésappariements ne touchant qu'une seule base, ainsi que les insertions/délétions d'un seul nucléotide sont réparés par le complexe MSH2-MSH6, en revanche le complexe MSH2-MSH3 est chargé de la réparation d'insertions/délétions de plus grandes tailles (2 à 16 nucléotides) ²⁰.

<i>E. Coli</i>	<i>S. Cerevisiae</i>	<i>H. Sapiens</i>
MutS	Msh1	/
	Msh2	MSH2
	Msh3	MSH3
	Msh4	MSH4
	Msh5	MSH5
	Msh6	MSH6
MutL	Mlh1	MLH1
	Pms1	PMS2
	Mlh2	PMS1
	Mlh3	MLH3
MutH	/	/

Table 2 : Homologies des gènes MMR chez *E. coli*, *S. Cerevisiae* et *H. Sapiens*

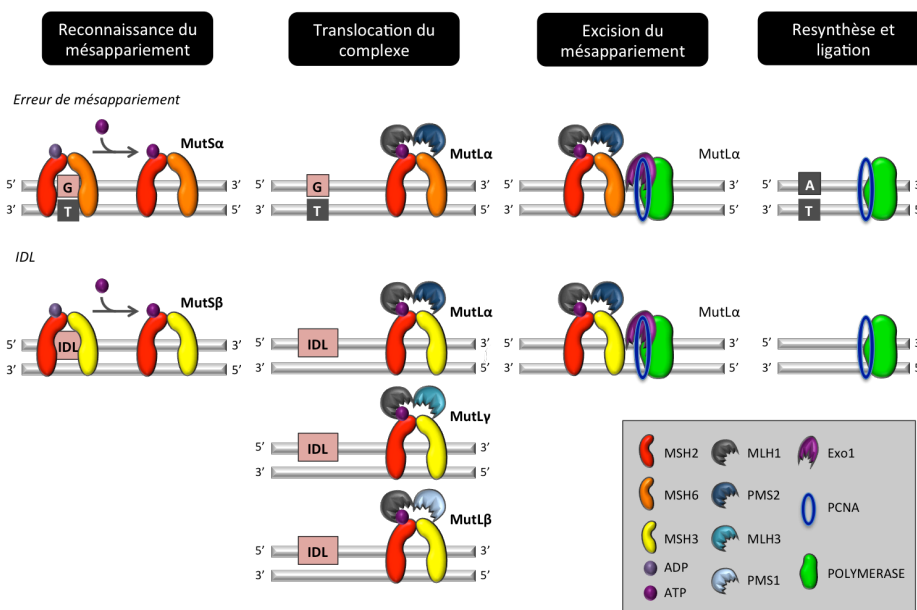


Figure 3 : Le système de réparation des mésappariements de bases (MMR) chez l'homme.

IDL: Insertion Deletion Loop. D'après Boland et al., 2010, *Gastroenterology*.

Après cette étape de reconnaissance, la protéine MLH1 va interagir avec la protéine PMS2, PMS1 ou MLH3 pour former respectivement le complexe MutLα, MutLβ ou MutLγ. L'excision de l'erreur sur le brin d'ADN néosynthétisé est effectuée par les protéines exonucléase 1 et PCNA (pour Proliférant Cell Nuclear Antigen), suivie de la resynthèse du brin d'ADN manquant et de la ligation²⁰.

b. La déficience du système MMR, responsable de l'oncogenèse MSI

Qu'elles soient héréditaires (syndrome de Lynch) ou sporadiques, les tumeurs MSI sont la conséquence directe d'un défaut du système MMR, consécutif à l'inactivation biallélique d'un des gènes majeurs de ce système. Dans le cas de cancers MSI héréditaires, les protéines impliquées sont principalement MSH2 et MLH1, et moins fréquemment MSH6 et PMS2, suite à une mutation germinale sur un des gènes ^{14, 16, 21, 22}. Dans le cas de cancers MSI sporadiques, il s'agit dans l'immense majorité des cas d'un défaut épigénétique touchant le promoteur du gène *MLH1* ²³⁻²⁵. Des publications très récentes attestent néanmoins de l'existence de tumeurs MSI sporadiques qui découlent de processus d'inactivation bi-allélique d'un gène MMR sans hyperméthylation de *MLH1* ²⁶.

La déficience de ce système n'est pas en soi un évènement transformant et il est maintenant établi que la transformation des clones MMR-déficients dépend de l'accumulation de mutations secondaires affectant des gènes ayant un rapport avec l'oncogenèse. De telles mutations secondaires sont en majorité accumulées du fait de l'instabilité microsatellitaire dans ces cellules. Ces mutations affectent des gènes impliqués dans des processus biologiques divers (notion de gènes cibles de MSI ; cf. infra) : régulation du cycle et/ou de la prolifération cellulaire, régulation de l'apoptose, réparation et signalisation des dommages de l'ADN. De nombreux gènes contenant des microsatellites codants sont mutés dans les tumeurs MSI (*TGFBR2*, *BAX*, *CASP5*...) mais un faible nombre a fait l'objet d'études fonctionnelles.

Le développement de lignées murines avec des mutations inactivatrices de tous les gènes connus du système MMR a permis d'estimer le rôle individuel de la perte de fonction de chacun de ces gènes dans la carcinogenèse MSI. En général, le phénotype de ces souris corrèle assez bien avec les défauts de réparation ainsi que les mutations observées chez les patients atteints d'un syndrome de Lynch. Ces souris ont la particularité de développer des lymphomes à un âge assez précoce (notamment pour les souris *MLH1* ^{-/-} et *MSH2* ^{-/-}) avec une diminution sévère de la survie. Les souris, en fond génétique C57BL/6 (B6), développent également des tumeurs gastro-intestinales et de la peau, qui sont cependant très peu observées suite à leur apparition tardive et la mort précoce des souris à cause des lymphomes très agressifs. Les tissus et les tumeurs de ces souris déficientes présentent une fréquence de mutation élevée ainsi qu'une instabilité au niveau des

séquences microsatellites. Il est cependant important de préciser qu'en fonction du gène MMR déficient considéré, la survie et le développement tumoral sont variables. (Pour revue ²⁷).

3. Les cancers MSI héréditaires : syndrome de Lynch ou HNPCC

Le syndrome de Lynch ou HNPCC est une prédisposition héréditaire au cancer, de transmission autosomique dominante, expliquant 5% environ des cancers colorectaux (soit 1/3 environ des CCR MSI).

Le Dr Warthin fût le premier, en 1913, à décrire l'existence d'une prédisposition génétique au développement des tumeurs du côlon et d'autres sites, en particulier des cancers de l'endomètre dans une famille (Warthin 1913). En 1966, le Dr Henry T. Lynch suggérait l'existence d'un syndrome qu'il nomma « syndrome des cancers familiaux », et qui était caractérisé par l'observation fréquente de tumeurs de localisations multiples, le plus souvent rencontrées au niveau du côlon ou de l'endomètre, au sein de patients issus d'une même famille.

Aujourd'hui, ce syndrome est nommé syndrome de Lynch (anciennement HNPCC pour Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer) par opposition à la FAP (pour Familial Adenomatous Polyposis), autre prédisposition génétique au cancer du côlon décrite chez des patients porteurs le plus souvent de mutations germinales dans le gène *APC* et présentant de nombreux polypes intestinaux bénins qui dégénèrent en tumeurs malignes. Les mutations des gènes *MLH1* et *MSH2* représente 90% des cancers héréditaires MSI ²⁸, ²⁹. Il n'y a pas véritablement de points chauds de mutations pour ces deux gènes. En accord avec la base de donnée *InSIGHT* (International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors ; www.insight-group.org), plusieurs centaines de mutations différentes ont été décrites. Les mutations sont principalement des substitutions d'une seule base (mutation faux-sens ou non-sens), des petites insertions/délétions de quelques nucléotides ou encore des changements au niveau de site d'épissage. Les mutations au niveau du gène *MSH6* surviennent dans approximativement 7 à 10 % des cancers Lynch, alors que les mutations dans le gène *PMS2* sont très rare (1 à 2% des cas).

La mutation sur le deuxième allèle d'un des gènes du MMR survient de manière sporadique, chez l'adulte jeune (généralement avant 50 ans). Cette perte induit une

inactivation du système MMR conduisant à une instabilité génétique augmentant le taux de mutations sur les microsatellites dans l'ensemble du génome, favorisant l'émergence d'une prolifération cellulaire MMR-déficiente du fait de MSI et des mutations somatiques qui sont favorisées dans le contexte.

Le risque de développement tumoral ne se limite pas au côlon puisque les femmes porteuses d'un syndrome de Lynch ont également un risque cumulé de cancers de l'endomètre de plus de 40%. D'autres localisations tumorales plus rares peuvent être observées. On retient les tumeurs des voies urinaires, de l'intestin grêle, de l'estomac, des voies biliaires, des ovaires, du pancréas ainsi que des tumeurs cérébrales.

Historiquement, l'identification des patients Lynch était basée exclusivement sur des données cliniques d'histoire personnelle et familiale très spécifiques mais peu sensibles, on parle des critères d'Amsterdam de type I puis II ^{30, 31} (**Table 3**). Beaucoup de patients porteurs de mutations constitutionnelles sur un gène MMR, et donc Lynch, ne sont pas identifiés par ces critères, certainement du à la pénétrance différente pour chaque gène. Suite à la découverte en 1993 des gènes responsables de ce syndrome, ces critères cliniques ont été élargis lors de la conférence de Bethesda en 1997 puis en 2004, permettant la sélection de patients pour lesquels on propose une recherche de phénotype MSI tumoral préalablement à l'analyse constitutionnelle des gènes MMR, augmentant ainsi la sensibilité du dépistage ^{32, 33} (**Table 4**).

Critères d'Amsterdam révisés	
1	Trois sujets apparentés doivent être atteints de cancers associés au syndrome HNPCC (colon, rectum, endomètre, intestin grêle, uretère, rein)
2	L'un des trois doit être apparenté au premier degré des deux autres
3	Au moins deux générations successives doivent être affectées
4	Un des cas de cancer doit être diagnostiqué avant l'âge de 50 ans
5	Le diagnostic de polypose adénomateuse familiale doit être impérativement exclu dans les cas où un cancer colorectal est diagnostiqué
6	Le diagnostic de tumeur colique doit être confirmé anatomopathologiquement

Table 3 : Critères d'Amsterdam révisés (II).
D'après Vasen HF et al., *Gastroenterology*, 1999.

Critères de Bethesda révisés	
Les tumeurs doivent être analysées pour leur statut MSI dans les cas suivants:	
1	Cancer colorectal diagnostiqué avant 50 ans
2	Présence d'au moins 2 tumeurs du spectre large synchrones ou métachrones quel que soit l'âge
3	Cancer colorectal d'histologie évocatrice * d'un phénotype MSI diagnostiqué avant 60 ans
4	Patient atteint de cancer colorectal ayant un apparenté au premier degré atteint d'une tumeur du spectre large, l'une des tumeurs ayant été diagnostiquée avant 50 ans
5	Patient atteint de cancer colorectal ayant deux apparentés ou plus au premier ou deuxième degré atteint d'une tumeur du spectre large, quel que soit l'âge

Table 4 : Critères de Bethesda.

* Lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL), réaction lymphocytaire de type Crohn, cellules mucineuses en bague à chaton ou aspect moléculaire. *D'après Umar A et al., JNCI, 2004.*

4. Les cancers MSI sporadiques

Les cancers MSI sporadiques sont de loin ceux qui ont été les mieux étudiés jusqu'alors. Ils représentent 10% environ des cancers sporadiques du côlon, de l'estomac et de l'endomètre ³⁴. Dans ces cancers, il est assez rare de mettre en évidence des mutations sur la séquence codante des gènes MMR, notamment *MLH1* et *MSH2*, alors que telles altérations sont retrouvées dans la majorité des cas de cancers familiaux du côlon Lynch. Néanmoins, de telles mutations (altérations bi-alléliques et somatiques sur un gène MMR) ont été récemment rapportées en nombre au niveau de patients avec un cancer colorectal MSI et sans mutation germinale identifiée ²⁶. Une des grandes caractéristiques de ces tumeurs, par rapport aux cancers MSI héréditaires, reste l'inactivation du gène *MLH1* par méthylation biallélique de son promoteur ²⁵, associée à une perte de l'expression de ce gène. Le premier article faisant état de la méthylation du promoteur de *MLH1* fût publié en 1997 ²³. Seule la méthylation de la région proximale du promoteur de *MLH1* induit un *silencing* du gène. Si la méthylation se situe dans la région distale, il n'y aura pas d'impact sur l'expression de ce gène ³⁵.

5. Caractéristiques cliniques des tumeurs MSI et méthodes diagnostiques

a. Caractéristiques cliniques et pronostiques

Les CCR MSI sont connus pour avoir des caractéristiques clinico-pathologiques distinctes. La différence entre les CCR MSI et les CCR MSS ne se limite pas uniquement aux caractéristiques moléculaires. En effet, d'un point de vue clinique, les CCR MSI ont une initiation tumorale rapide et une progression tumorale plus lente, sont des tumeurs volumineuses localisées principalement dans le côlon proximal ^{9, 11}, peu différenciées, mucineuses, présentant une forte infiltration lymphocytaire ^{36, 37}.

Les CCR MSI sont plus fréquemment de stade II que de stade III (avec une infiltration des ganglions lymphatiques), et sont rarement de stade IV (cancer métastatique à distance). De plus, les cancers colorectaux MSI sont détectés plus fréquemment chez la femme que chez l'homme (forme sporadique de la maladie, sexe ratio de 2 pour 1).

Gryfe *et al.* ont été les premiers à montrer sur une cohorte de CCR MSS et MSI que les tumeurs MSI avaient un meilleur pronostic que les tumeurs MSS et qu'elles étaient moins à même de métastaser dans les ganglions lymphatiques ou à distance ³⁸. Plus récemment, une méta-analyse réalisée par Popat *et al.*, regroupant les données de 32 études différentes (soit au total 7642 patients dont 1277 avec des CCR MSI) a confirmé de manière significative l'avantage pronostique de ces tumeurs ³⁹. En revanche, il a récemment été décrit que les CCR MSI métastatiques (stade IV) ne sont pas associés à une meilleure survie par rapport aux cancers MSS de même stade et que la mutation BRAF^{V600E} semblent être un facteur de mauvais pronostic dans ces cancers ⁴⁰.

b. Marqueurs pronostiques

Plusieurs facteurs moléculaires ont été mis en évidence comme pouvant influencer le pronostic des cancers colorectaux ^{41, 42, 43, 44} (**Figure 4**). Ces facteurs incluent la déficience du système MMR, le phénotype CIMP ainsi que les mutations des oncogènes *BRAF* et *KRAS*. Brièvement, les tumeurs MSI sporadiques, et non héréditaires, portent

fréquemment une mutation activatrice V600E sur l'exon 15 de l'oncogène *BRAF*⁴⁵. Les mutations *BRAF*^{V600E} sont exclusives des mutations au niveau des codons 12 et 13 de *KRAS*⁴⁶, détectées dans 30-40% des CCR en général⁴⁷. *BRAF* est muté dans environ 35% des tumeurs MSI et 5% des tumeurs MSS colorectales.

Depuis peu, de nouvelles classifications des CCR sont apparues, prenant en compte des caractéristiques plus globales grâce à des approches *omiques* (technologies permettent de générer des quantités énormes de données à des niveaux multiples)^{48, 49, 50}.

En exemple, l'étude de Marisa L *et al.*, classe les cancers colorectaux en 6 catégories allant de C1 à C6 (**Figure 4**). Les cancers de la classe C4 et C6 ont un plus mauvais pronostic que les autres (**Figure 4**).

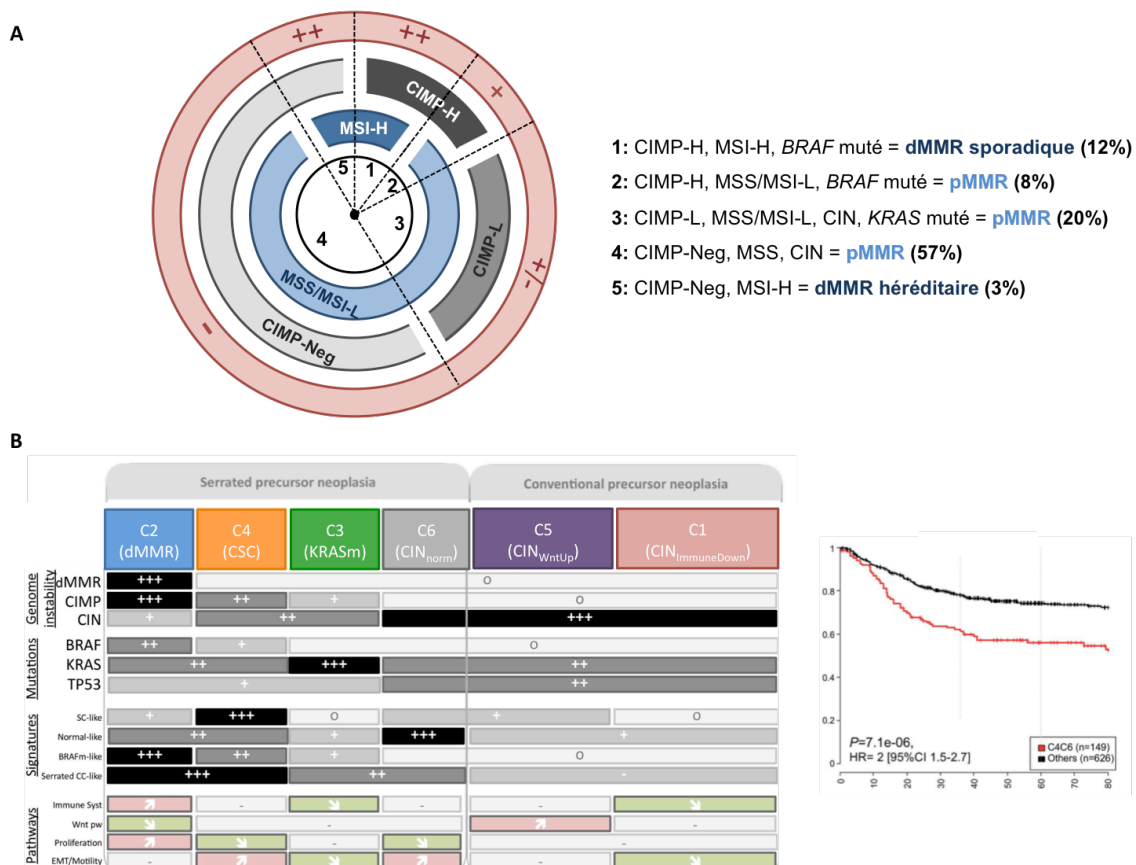


Figure 4 : Marqueurs pronostiques de MSI.

A) Classification moléculaire des cancers colorectaux en fonction du statut CIMP (H: High, L: Low, Neg: negative) et MSI. D'après Jass et al., *Histopathology*, 2007. Le cercle rouge indique le pronostic des tumeurs en fonction de leur classification. D'après Sinicrope F et al., *Gastroenterology*, 2014.

B) Principales caractéristiques des 6 classes de cancers colorectaux obtenues par analyse du génome et du transcriptome. dMMR: MMR déficient; CSC: cellules souches cancéreuses; KRASm: *KRAS* muté; CIN_{norm}: expression normale des gènes; CIN_{WntUp}: sur-expression de la voie Wnt; CIN_{ImmuneDown}: sous-expression de la voie immunitaire; o: fréquence très basse; +++: haute fréquence; +/++: fréquence intermédiaire. Les flèches indiquent la sur ou sous-expression des gènes correspondant à chaque voie; EMT: Epithelial Mesenchymal Transition; SC: Stem Cell; Wnt pw: Wnt pathway. D'après Marisa et al., *PlosMedicine*, 2013.

c. Méthodes diagnostiques

Il est maintenant généralement admis que la détermination du statut MSI des tumeurs est utile car il permet d'identifier les patients Lynch (critères familiaux et/ou cliniques utilisés jusqu'à présent peu sensibles ou peu spécifiques).

Suite à la découverte du phénomène d'instabilité des microsatellites, le National Cancer Institute organise en décembre 1997 « The international Workshop on Microsatellite Instability and RER phenotypes in Cancer Detection and Familial Predisposition » au cours duquel il a été proposé un panel de 5 microsatellites pour déterminer le statut MSI d'un cancer³⁴.

- **Diagnostic par une approche de PCR**

Le principe de la caractérisation MSI repose sur l'analyse des produits d'amplification par PCR de plusieurs régions non codantes contenant des microsatellites, de manière comparative dans l'ADN tumoral et l'ADN normal d'un même patient. Le panel recommandé lors de la réunion de consensus de Bethesda est composé de 5 microsatellites : 2 marqueurs mononucléotidiques (BAT25 et BAT26) et 3 marqueurs dinucléotidiques (D5S346, D2S123 et D17S250) (**Figure 5**). Par définition, une instabilité sur au moins 2 de ces 5 marqueurs caractérise une tumeur MSI-H (pour MSI-High). Les tumeurs ne présentant une instabilité que sur un seul marqueur sont MSI-L (pour MSI-Low). Les tumeurs MSS sont celles ne présentant aucune instabilité sur les 5 microsatellites. Il n'a jamais été obtenu de preuves évidentes et définitives de l'existence réelle du phénotype MSI-L qui ne se distingue pas, ou peu et de manière très controversée, du phénotype MSS.

Les critères pour reconnaître les tumeurs MSI ont été révisés en 2002, à la suite de plusieurs études mettant en évidence un certain nombre de défauts du premier panel proposé, du fait notamment de l'utilisation de marqueurs dinucléotidiques ³³. Le panel original de Bethesda n'est pas déconseillé, mais il est maintenant suggéré d'utiliser en priorité des marqueurs mononucléotidiques pour identifier les tumeurs MSI. Un panel de 5 marqueurs mononucléotidiques (BAT25, BAT26, NR21, NR24 et NR27), proposé par notre équipe ⁵¹, a pu être ainsi recommandé ³³ (**Figure 5**).

Outre une extrême sensibilité et spécificité, ce dernier panel a l'avantage d'être constitué de marqueurs quasi-monomorphes (c'est-à-dire présentant très peu de polymorphismes de taille dans les ADNs normaux) dans la population mondiale, si bien que l'analyse comparative de l'ADN constitutionnel des patients n'est, en règle générale, pas requise. Dans ce contexte, comme il existe tout de même quelques variants alléliques de ces marqueurs, une tumeur ne doit être considérée comme MSI que si elle montre une instabilité au niveau de 3 au moins de ces 5 microsatellites mononucléotidiques. Pour certaines localisations tumorales, dans lesquelles l'instabilité des microsatellites est moins prononcée, conduisant de fait à des variations de tailles de ces marqueurs plus discrètes et donc plus difficiles à identifier (endomètre par exemple), une comparaison avec l'ADN normal correspondant des patients reste recommandée ⁵².

- **Diagnostic par une approche d'immunohistochimie**

Une alternative à l'allélotypage de microsatellites est l'immunohistochimie. Elle permet la détermination indirecte du statut MSI des échantillons étudiés par la mise en évidence d'une perte d'expression au niveau d'une des protéines du système MMR dans la cellule tumorale, les cellules normales contaminantes ou infiltrantes faisant fonction de contrôle interne d'expression. Pour être complète, cette analyse nécessite l'emploi de 4 anticorps dirigés contre MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 (**Figure 5**). Cette démarche méthodologique est considérée comme étant moins lourde et moins coûteuse que l'allélotypage des microsatellites, et elle est utilisée en routine dans de nombreux laboratoires d'anatomopathologie pour faire le diagnostic MSI des tumeurs. L'immunohistochimie ne permet pas néanmoins l'identification des cas porteurs d'une mutation faux sens, pouvant entraîner pourtant une perte de fonction d'un gène MMR, sans diminuer systématiquement le taux d'expression du gène concerné. L'immunohistochimie a l'avantage de cibler chaque perte MMR, et elle facilite donc la recherche de mutations constitutionnelles de ces gènes dans les familles Lynch.

Ces deux approches (PCR microsatellite et immunohistochimie MMR) sont utilisées en routine à l'hôpital Saint-Antoine et sont les 2 méthodes de référence à l'international pour identifier le phénotype MSI ou MSS d'un cancer.

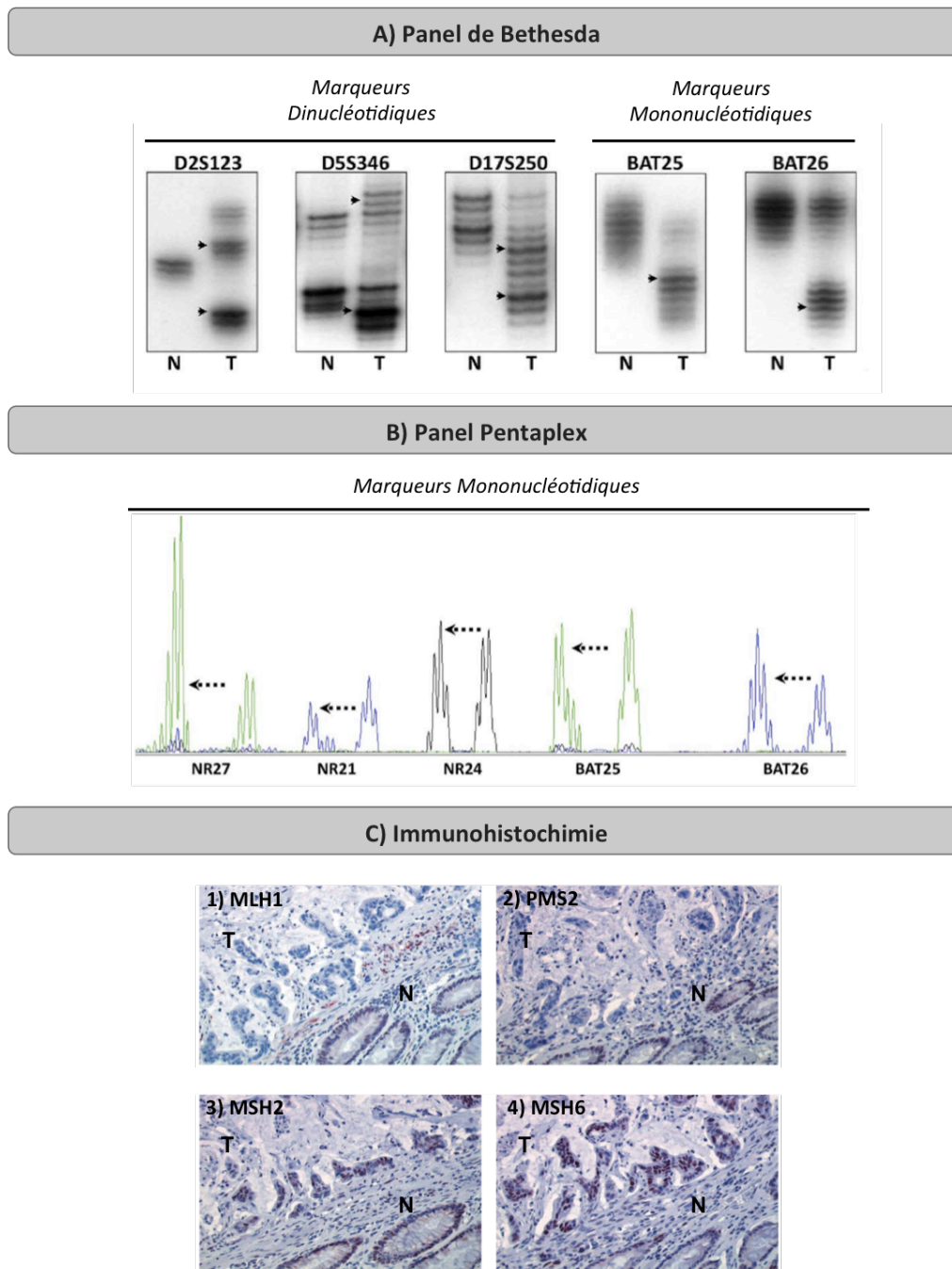


Figure 5 : Mise en évidence du phénotype MSI.

A) et B) Mise en évidence par amplification de 5 marqueurs. MSI est détectable par autoradiographie après électrophorèse des produits PCR (A) ou par électrophorèse capillaire avec des amorces fluorescentes (B). Les délétions se manifestent par l'apparition de bandes ou de pics supplémentaires (flèches). N: tissu normal; T: tissu tumoral. *D'après Boland et al., Gastroenterology, 2010.*

C) Mise en évidence par immunohistochimie. Exemple d'une tumeur colique MSI ayant perdu l'expression des protéines 1) MLH1 et 2) PMS2, mais conservé l'expression des protéines 3) MSH2 et 4) MSH6. N: tissu normal; T: tissu tumoral. *D'après Svreck et al., JCO, 2007.*

6. Réponse aux traitements de chimiothérapie

Les protocoles de chimiothérapie des patients atteints de CCR MSI ne diffèrent pas de ceux atteints de tumeurs MSS. Certains patients sont traités par chimiothérapie adjuvante à la chirurgie afin de diminuer les risques de rechute. En Europe, une chimiothérapie adjuvante est prescrite chez certains patients atteints de CCR de stade II (critères de gravité requis⁵³) et chez ceux avec un CCR de stade III. Les CCR de stade II sont traités par chirurgie seule (*a fortiori* de stade I). Aux Etats-Unis, seul les CCR de stade III sont traités par chirurgie et chimiothérapie adjuvante. Dans les stades IV, les protocoles sont plus complexes et peuvent comporter une phase de traitement par chimiothérapie néo-adjuvante (c'est à dire préalablement à la chirurgie). Néanmoins, les CCR MSI sont très rarement de stade IV au moment du diagnostic.

Il existe aujourd'hui 3 principaux agents chimiothérapeutiques administrés en routine chez les patients atteints de CCR : le 5-Fluorouracil (5-FU), l'oxaliplatine et l'irinotécan.

Le 5-FU constitue la base de la chimiothérapie des patients avec un CCR. Il n'est plus utilisé seul aujourd'hui mais en combinatoire. De nombreuses études ont fait état d'une résistance accrue des tumeurs coliques MSI à cette drogue en particulier (par rapport aux CCR MSS), et ont même clairement remis en question son intérêt chez les malades avec un CCR MSI (pas de gain en survie en comparaison d'une absence de chimiothérapie chez eux). Depuis 2004, les patients opérés pour un CCR de stade III sont traités par le protocole FOLFOX, une combinaison de 5-FU, d'oxaliplatine et d'acide folique. Les cancers colorectaux métastatiques (de stade IV) sont traités par le protocole FOLFIRI, une combinaison de 5-FU, d'irinotécan et d'acide folique. Au même titre que l'irinotécan, des anticorps monoclonaux ciblant les facteurs VEGF (pour Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) et EGFR (pour Epidermal Growth Factor Receptor) sont également utilisés en combinaison avec d'autres chimiothérapies pour le traitement des carcinomes colorectaux métastatiques. Il existe des anticorps anti-VEGF, le bevacizumab, des anticorps anti-EGFR, le cetuximab et le panitumumab, ou encore des agents anti-VEGF comme l'aflibercept et le regorafenib.

a. Le 5-Fluorouracil (5-FU)

L'activité anti-tumorale du 5-Fluorouracil a été rapporté pour la première fois en 1957, par Heidelberger *et al.*,⁵⁴. Cinquante ans après cette découverte, le 5-FU a prouvé son impact sur la survie des patients atteints de CCR et est devenu un composé standard des thérapies adjuvantes. Le 5-FU est une fluoropyrimidine qui inhibe l'enzyme TS (pour Thymidylate Synthase) qui convertit les dUMP en dTMP et qui s'incorpore dans l'ARN et également dans l'ADN^{55, 56, 57} sous forme de métabolite actif 5FdUTP (pour FluorodesoxyUridine TriPhosphate).

Aujourd'hui, le 5-FU seul n'est plus utilisé seul dans le cadre de chimiothérapie adjuvante. De nombreuses publications ont rapporté que le traitement au 5-FU ne présentait aucun effet bénéfique chez les patients atteints de CCR MSI comparé aux CCR MSS^{58, 59, 60}, et qu'il pourrait même avoir un effet délétère⁶¹.

A ce jour, plusieurs études ont décrits différents mécanismes qui pourraient expliquer la résistance des tumeurs MSI au 5-FU, liée à son activité inhibitrice de la TS qui induit une augmentation de l'incorporation des substrats dUTP et 5FdUTP dans l'ADN à la place du substrat dTTP⁶². Dans la cellule, le 5-FU va être convertit en un métabolite actif, le 5FdUMP (pour FluorodesoxyUridine MonoPhosphate) puis 5FdUTP. Au final, le traitement au 5-FU induit la mort cellulaire selon deux modèles : soit des cycles futiles de réparation suite à l'incorporation de dUTP et de 5FdUTP, soit une reconnaissance directe de dommages et une activation de l'apoptose⁶².

Il a été démontré que le système de réparation MMR, et en particulier le complexe MutSα (MSH2-MSH6), reconnaît le 5-FU incorporé dans l'ADN^{62, 63, 64} et que ce mésappariement serait corrigé par ce système. D'après l'étude de Tajima A *et al.*,⁶², la résistance des CCR MSI au 5-FU serait vraisemblablement due à l'incorporation de métabolites de 5-FU dans l'ADN. On observera une incorporation de 5-FU dans les molécules d'ADN lors de la réplication, mais cette erreur de mésappariement ne sera pas reconnue puisque le système MMR est déficient. La mort cellulaire ne pourra être induite, et la cellule pourra continuer à proliférer avec ces erreurs de mésappariements.

Le gène *MBD4* est muté dans les cancers colorectaux MSI, au niveau d'un microsatellite codant ⁶⁵. Ce gène code pour une thymine DNA glycosylase, protéine impliquée dans le système de réparation du BER (pour Base Excision Repair), système également impliqué dans la reconnaissance et la réparation des dommages causés par le 5-FU. Il a été rapporté que les cellules déficientes en MBD4 étaient résistantes au 5-FU ^{66, 67}. La perte de cette protéine dans les CCR MSI du fait des mutations récurrentes qui l'affectent pourrait également être une autre explication de la résistance au 5-FU observée dans ces cancers ⁶⁸.

D'après une étude récente ⁶⁹, la résistance des cancers MSI au 5-FU serait liée à une surexpression de l'enzyme TS ainsi que de l'enzyme DPD (pour DihydroPirimidine Dehydrogenase, responsable du catabolisme de 85% du 5-FU) dans les tumeurs MMR déficientes comparées aux tumeurs proficientes. Ceci pourrait être un dernier mécanisme expliquant la résistance des cancers MSI au 5-FU.

En parallèle de ces publications sur la résistance des CCR MSI au 5-FU, d'autres publications ont rapporté que les tumeurs MSI présentaient une réponse bénéfique à ce traitement ^{70, 71}. D'après Sinicrope *et al.*, ⁷¹, les patients atteints de CCR MSI de stade III traités par 5-FU ont un taux de récurrence tumorale à distance diminuée par rapport aux patients sans traitement ou avec une chirurgie seule (11% vs 29%, ; p= .011). De plus, les auteurs ont constaté que parmi les patients avec une tumeur MSI, ceux avec une mutation héréditaire d'un des gènes du système MMR, traitées par 5-FU, montraient une meilleure DFS (pour Disease-Free Survival, survie sans récurrence) que ceux avec une tumeur sporadique et traités dans les mêmes conditions. Il semble que l'origine héréditaire ou sporadique d'une tumeur colorectale MSI soit donc un critère important à prendre en compte pour juger de l'efficacité du 5-FU en tant qu'agent de chimiothérapie chez les malades.

b. Le protocole FOLFOX

Le traitement FOLFOX (pour FOLinique acid, 5-Fluorouracil, OXaliplatin) est une combinaison de 5-FU, d'acide folique (inhibant de façon plus stable l'enzyme TS) et d'oxaliplatine.

En plus des effets fonctionnels causés par le 5-FU et l'acide folique, l'oxaliplatine, un agent alkylant, va induire des pontages intra brins ou inter brins entre deux guanines, rendant impossible la transcription et causant l'accumulation des cassures double brin au moment de la réplication de l'ADN. Les dommages causés par l'oxaliplatine sont réparés principalement par les systèmes NER (pour Nucleotide Excision Repair) et BER (pour Base Excision Repair).

Si au départ le FOLFOX a été décrit comme bénéfique dans les CCR métastatiques ⁷², il est devenu un standard dans le traitement des cancers colorectaux non métastatiques avec une infiltration des ganglions lymphatiques, soit les cancers de stade III, et les cancers stade II à « haut grade » (les cancers de stade IIb selon la classification TNM), notamment grâce à l'essai clinique MOSAIC (Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the adjuvant treatment of colon cancer) ^{53, 73}.

Aujourd'hui, le FOLFOX vient constituer le traitement standard pour les tumeurs colorectales, quel que soit leur phénotype moléculaire (MSS ou MSI). A ce jour, l'effet bénéfique du traitement FOLFOX dans les tumeurs MSI reste encore à démontrer.

Une étude a permis de rapporter une survie sans récurrence significativement améliorée chez les patients traités par FOLFOX *versus* 5-FU seul lorsque la tumeur était MSI (pas d'effet significatif du FOLFOX en revanche chez les patients avec un CCR MSS au diagnostic) ⁷⁴. Une autre étude rapporte une tendance pour un meilleur pronostic des CCR MSI vs MSS traité par FOLFOX ⁷⁵. Cependant, ces études sont basées sur l'analyse de petites cohortes de patients avec un CCR MSI (20 à 30 cas dans chaque bras au maximum). D'autres publications suggèrent que le statut MMR-déficient d'une tumeur, s'il ne permet pas de procurer un effet bénéfique en réponse au traitement FOLFOX, n'entraîne pas sa résistance, alors que cela semble être le cas vis à vis du 5-FU seul, comme décrit précédemment ^{76, 77}. Il est donc suggéré qu'au minimum, l'ajout d'oxaliplatine permettrait de surmonter l'impact négatif du 5-FU seul dans le traitement des CCR MSI, et serait donc une drogue particulièrement d'intérêt pour ces tumeurs.

L'oxaliplatine fait partie de la famille des platines, au même titre que la cisplatine et la carboplatine. Il a été rapporté que la perte d'activité du système MMR conférerait une résistance au cisplatine et au carboplatine mais pas à l'oxaliplatine ^{78, 79}. Brièvement, un système MMR fonctionnel est requis pour la détection des dommages causés par le

cisplatine et le carboplatine ^{80, 81}. Les complexes de platine interfèrent avec le MMR et préviennent une réparation avant qu'elle soit complète. L'incapacité de réparer complètement ces dommages mène à l'apoptose. Quand le MMR est déficient, la cellule peut continuer à proliférer en dépit de ces dommages et devient donc résistante aux complexes de platines. En revanche, il semblerait que les protéines MMR ne reconnaissent pas ces adduits de l'ADN formés par l'oxaliplatine. Une petite analyse rétrospective a fait état de la survie de patients atteints de cancer du poumon à petites cellules traités par gemcitabine et oxaliplatine versus gemcitabine et cisplatine ⁸². Les auteurs constatent que les patients ayant perdu MSH2 dans la tumeur sont plus sensibles à l'oxaliplatine que les patients ayant conservé une expression normale de MSH2, suggérant ainsi que l'oxaliplatine serait plus active dans des cellules MMR déficientes. Il reste difficile de comparer par une approche prospective la réponse des cancers colorectaux MSI au traitement FOLFOX par rapport au 5-FU seul, ce dernier n'étant plus utilisé seul en chimiothérapie adjuvante.

La valeur prédictive à l'oxaliplatine a également été investiguée pour les gènes *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *MET* et *PIK3CA* ^{77, 83}. Les mutations des gènes *BRAF*^{V600E} et *KRAS* sont associées de façon indépendante à une diminution de la DFS chez les patients traités par FOLFOX, à savoir qu'une partie des cancers MSI sont mutés sur le gène *BRAF* ⁸³. A ce jour, la réponse des tumeurs MSI au traitement FOLFOX est encore imprécise et de nombreux facteurs semblent influencer cette réponse.

III) Notion de gènes cibles de l'instabilité microsatellitaire

De nombreuses altérations génétiques et épigénétiques ont été décrites dans les cancers colorectaux. Les principales sont compatibles avec le modèle de progression tumorale de CCR proposé par Fearon et Vogelstein⁸⁴. Il inclut une inactivation biallélique des gènes suppresseurs de tumeurs *APC*, *TP53* et *DPC4* et des mutations activatrices des oncogènes *BRAF* et *KRAS* (Figure 6). Cependant, ce modèle est adapté avant tout au modèle d'initiation et de progression tumorale MSS et convient moins bien au type MSI qui n'est pas lié (ou peu) à l'inactivation du gène suppresseur de tumeurs *APC* par exemple.

Aussi bien dans les CCR MSI héréditaires que sporadiques, le premier évènement est l'inactivation du système MMR, évènement non transformant par lui même. Du fait de la déficience MMR, les cellules vont accumuler de nombreuses mutations au niveau des microsatellites, site privilégié de l'instabilité génétique dans les tumeurs MSI (Figure 6). Les séquences répétées microsatellites peuvent être localisées au niveau des exons de certains gènes humains. Ces gènes sont appelés gènes cibles de l'instabilité microsatellitaire.

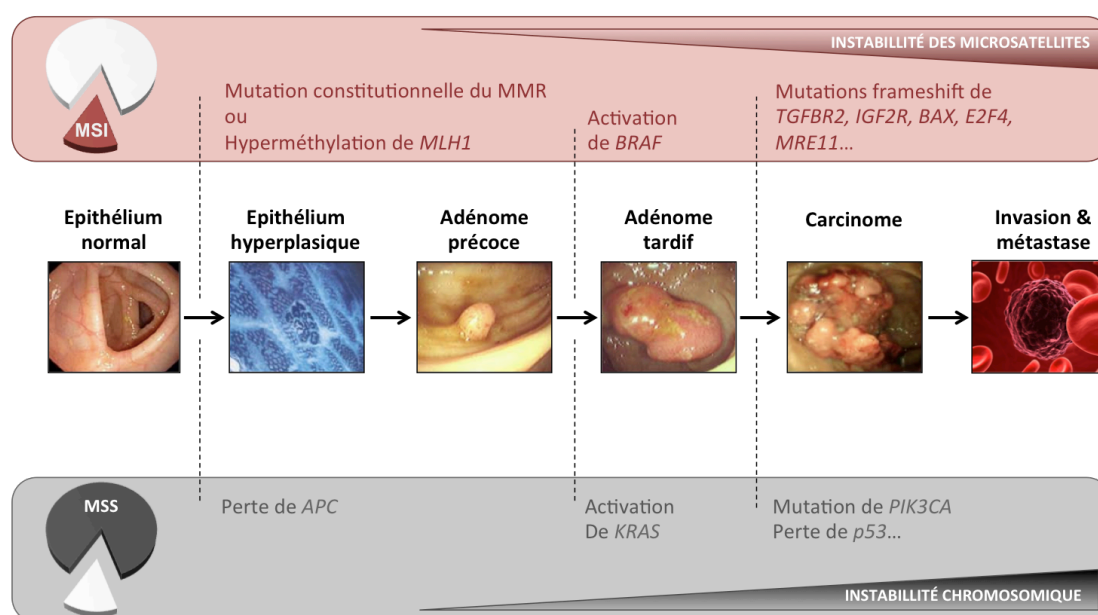


Figure 6 : Modèle génétique multi-étape de la carcinogenèse colorectale.

D'après Pino M et al., *Gastroenterology*, 2010 et Vilar E et al., *Nat Rev Clin Oncol*, 2010.

Jusqu'à aujourd'hui, l'immense majorité des études a porté sur l'analyse de mutations présentes au niveau de microsatellites codants. Mon laboratoire d'accueil, et d'autres, ont

décrit les principales altérations somatiques de séquences microsatellites en rapport avec la déficience du système MMR, identifiant certaines des mutations les plus fréquentes au niveau de séquences microsatellitaires codantes localisées dans des gènes associés à des processus biologiques divers reliés à l'oncogenèse, *e.g.* cycle et/ou la prolifération cellulaire, apoptose, réparation et signalisation des dommages de l'ADN. (Pour revue ⁸⁵). Cependant, la plupart des séquences répétées se trouvent localisées dans des régions intergéniques et non codantes de l'ADN.

Comme nous le verrons, peu d'études ont exploré les mutations de microsatellites non codants puisque les altérations de ces répétitions sont pour la plupart sans conséquence fonctionnelle et il est donc beaucoup plus difficile d'appréhender leur rôle dans l'oncogenèse.

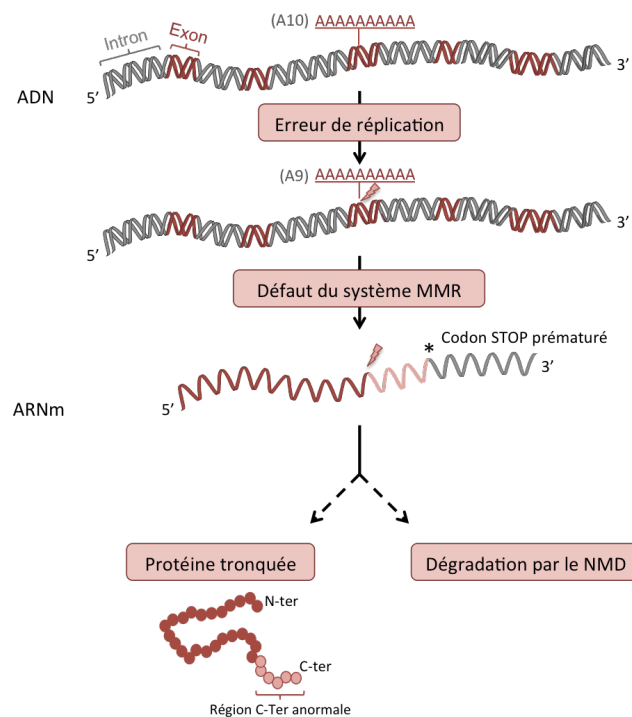


Figure 7 : L'oncogenèse MSI.

1. Mutation de microsatellites présents dans la région codante des gènes

Les microsatellites codants sont généralement des répétitions mononucléotidiques d'une taille comprise entre 6 et 10 nucléotides. Les mutations survenant à leur niveau dans les cancers MSI sont le plus souvent des délétions, plus rarement des insertions, de 1 ou 2 bases. La conséquence de telles altérations est un décalage du cadre de lecture, conduisant à la formation d'un codon STOP prématuré et la production d'une protéine tronquée (**Figure 7**).

Le premier gène cible impliqué dans la carcinogenèse MSI à avoir été décrit est le gène codant pour le récepteur de type II du TGF β (*TGFBR2* pour Transforming Growth Factor β Receptor type 2)⁸⁶. La voie du TGF β régule de nombreux processus et en particulier la prolifération au niveau épithélial et dans le côlon en particulier. La perte de cette fonction de régulation semble contribuer au développement tumoral. Il a été montré que le gène *TGFBR2* était muté sur la répétition codante de 10 adénines (A₁₀) (1 ou 2bp de délétions) dans 9 lignées MSI sur 11 (82%). Cette séquence répétée est située au début de la séquence codante et, une fois mutée, la mutation engendre la formation d'une protéine tronquée non fonctionnelle⁸⁷. La mutation de cette séquence A₁₀ est présente dans 90% des CCR MSI⁸⁸, et plusieurs études ont suggéré qu'elle joue son rôle dans l'étape d'initiation tumorale. Une équipe a montré, grâce à l'utilisation d'un modèle murin, que la perte de *TGFBR2* permettrait l'invasion et la transformation maligne de tumeurs initiées par la mutation de *APC*⁸⁹ suggérant que la perte de *TGFBR2* aurait un rôle pro-tumoral.

De nombreux autres gènes affectés par MSI ont été identifiés à la suite, codants par exemple pour des régulateurs de la prolifération cellulaire (*GRB1*, *TCF4*, *WISP3*, *ACTR2*, *IGF2R*, *AXIN-2*, *CDX*), du cycle cellulaire ou de l'apoptose (*BAX*, *CAPS-5*, *RIZ*, *BCL-10*, *PTEN*, *hG4-1*, *FAS*), ou encore pour des facteurs clés du processus de réparation de l'ADN (*MBD-4*, *BLM*, *CHK1*, *MLH3*, *RAD50*, *MSH3* et *MSH6*) (**Table 5**)⁸⁵. De façon remarquable, les gènes du système MMR eux-mêmes, à l'exception de *MLH1*, ont une répétition mononucléotidique codante d'au moins 7 nucléotides⁹⁰, et sont donc eux-mêmes de potentiels gènes cibles de MSI⁹¹. Plus généralement, il faut savoir qu'environ 20% des gènes humains contiennent au moins une séquence répétée codante \geq à 7 nucléotides, ce qui rend très élevé le nombre potentiel de gènes cibles de MSI⁹². Un grand nombre de ces

microsatellites codants ont été analysé par des approches de criblage dans différents travaux, permettant une analyse à grande échelle de leurs altérations dans des ADNs tumoraux afin d'établir un large éventail des fréquences mutationnelles de ces gènes cibles dans les tumeurs, en particulier coliques^{93, 94, 95}.

Gène	Fonction	Répétition	Localisation	CCR (%)	CG (%)	CE (%)
<i>ACVR2</i>	Récepteur de facteur de croissance	A8	exon	67.6	44.4	-
<i>AIM2</i>	Protéine inductible par l'interféron	A10	exon	51.7	33.3	50.0
<i>ATR</i>	Réponse aux dommages à l'ADN	A10	exon	24.5	20.6	7.3
<i>AXIN2</i>	Voie <i>Wnt/Wingless</i>	G7	exon	14.4	24.4	0.0
<i>BAX</i>	Facteur pro-apoptotique	G8	exon	41.5	37.3	24.0
<i>CASP5</i>	Facteur pro-apoptotique	A10	exon	47.6	38.6	11.4
<i>CHEK1</i>	Réponse aux dommages à l'ADN	A9	exon	12.1	5.6	8.5
<i>GRB14</i>	Protéine de liaison aux facteurs de croissance	A9	exon	27.9	24.4	14.3
<i>MBD4</i>	Réparation de l'ADN	A10	exon	24.6	20.1	9.9
<i>MLH3</i>	Réparation de l'ADN	A9	exon	15.9	0.0	7.9
<i>MRE11A</i>	Réparation de l'ADN	T11	intron	73.7	79.2	50.9
<i>MSH3</i>	Réparation de l'ADN	A8	exon	42.0	38.9	19.4
<i>MSH6</i>	Réparation de l'ADN	C8	exon	23.9	27.2	15.8
<i>PRKDC</i>	Réparation de l'ADN	A10	exon	23.5	14.9	22.1
<i>RAD50</i>	Réparation de l'ADN	A9	exon	30.8	31.5	9.6
<i>RIZ</i>	Cycle cellulaire et protéine apoptotique	A9	exon	23.5	36.6	10.7
<i>SLC23A1</i>	Transporteur de nucléobase	C9	exon	42.0	40.0	41.7
<i>TAF1B</i>	Initiation de la transcription	A11	exon	78.9	86.7	58.3
<i>TCF4</i>	Voie <i>Wnt/Wingless</i>	A9	exon	43.4	14.0	3.0
<i>TGFBR2</i>	Récepteur de facteur de croissance	A10	exon	73.8	64.5	14.5

Table 5 : Liste des gènes cibles mutés dans les cancers MSI les plus fréquemment cités dans la littérature.

Les données sont issues de la database *SelTarbase* 201307 mise à jour en juillet 2013 (<http://www.seltarbase.org/>). L'immense majorité des mutations rapportées touchent des microsatellites codants exoniques (à l'exception de *MRE11A*). CRC: Cancer ColoRectal ; CG: Cancer Gastrique ; CE: Cancer de l'Endomètre.

Le problème actuel n'est plus de découvrir de nouveaux gènes cibles mutés dans les cancers MSI, puisqu'ils sont déjà très nombreux, mais de déterminer ceux qui jouent un rôle significatif au cours de l'initiation et de la progression tumorale. On estime généralement que la mutation d'un gène cible susceptible d'intervenir dans la tumorigenèse MSI est sélectionné au cours de la progression tumorale et est muté à haute fréquence dans ces cancers. A l'opposé, les gènes ayant une faible fréquence de mutations sont considérés comme peu pertinents et sont le témoin du bruit de fond d'instabilité qui caractérise les tumeurs MSI. Différents tests statistiques ont été proposés dans le but de distinguer les vrais gènes cibles d'instabilité, de ceux correspondant au

bruit de fond d'instabilité dans les tumeurs MSI^{96, 97} (**Figure 8**). Actuellement, il existe la base de données *SeITarbase* qui répertorie les mutations de microsatellites mononucléotidiques exoniques et introniques, et leur impact potentiel sur la tumorigénèse⁹⁵. D'un point de vue fonctionnel, l'effet oncogénique de ces altérations reste à démontrer dans la grande majorité des cas. Lorsque ces répétitions sont localisées en début de séquence codante, il est probable que la protéine correspondante ne sera plus fonctionnelle, et la mutation est supposée « perte de fonction ». Dans les cas où les répétitions sont localisées plus en 3', d'autres répercussions fonctionnelles peuvent être éventuellement évoquées (effet dominant négatif, gain de fonction). Jusqu'à présent, parmi toutes ces mutations, peu de gènes ont un impact significativement fonctionnel sur le processus tumorigénique MSI. Récemment, des gènes avec des fonctions très spécifiques, telles que *l'Exportin-5* ou encore *TARBP2*, impliqués respectivement dans l'export nucléaire des miRNA et leur processing, ont été également rapportés comme étant des nouvelles cibles de MSI dans les cellules tumorales^{98, 99}, indiquant que la liste des mutations de gènes cibles de MSI n'est pas encore arrêtée.

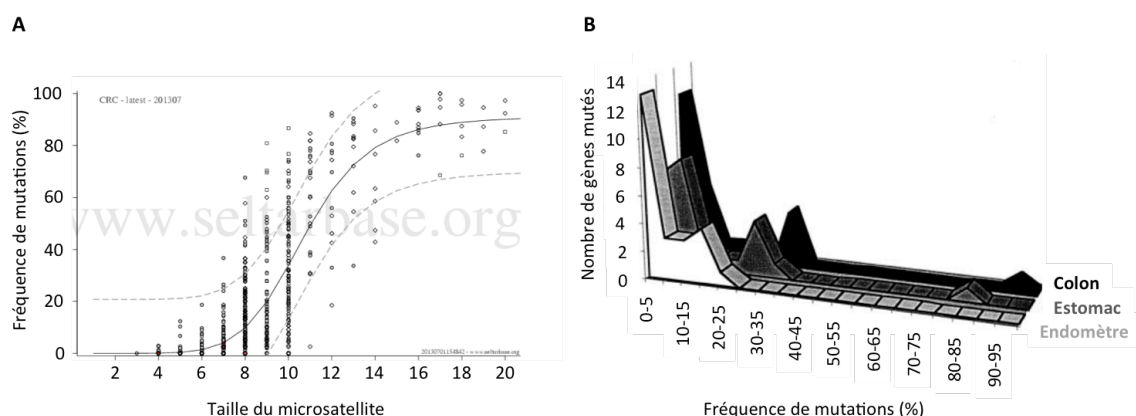


Figure 8 : Fréquences de mutations des gènes cibles de l'oncogénèse colorectale MSI.

A) Distribution selon Woerner *et al.*, dans les cancers colorectaux (D'après la base de donnée *SeITarbase* 201307 mise à jour en juillet 2013, <http://www.seltarbase.org/>).

B) Distribution selon Duval *et al.*, dans les cancers du côlon, de l'estomac et de l'endomètre. D'après Duval *et al.*, *Cancer Res*, 2002.

Bien que les défauts MMR soient différents entre les cas MSI héréditaires et sporadiques, il ne semble pas qu'il y ait, pour une même localisation tumorale, de différences fondamentales dans le répertoire de gènes cibles d'instabilité dans ces deux cas. En revanche, les gènes cibles d'instabilité semblent être tissu-spécifiques puisqu'ils diffèrent entre les tumeurs MSI gastro-intestinales et les tumeurs MSI de l'endomètre (**Figure 8**)¹⁰⁰.

Récemment, une équipe a confirmé ce fait par une analyse de séquençage Exome comparant des cancers colorectaux et des tumeurs de l'endomètre MSI ; certains gènes cibles sont communs à ces deux types de cancers, mais la majorité de ces gènes diffèrent entre ces deux localisations ¹⁰¹.

Il est important de préciser que les cancers colorectaux MSI sont sinon associés à une forte infiltration lymphocytaire des tumeurs ^{102, 103}, du fait que les mutations de microsatellites génèrent des peptides néo-antigéniques en nombre (notion d'immunité anti-tumorale) (**Figure 7**) ^{104, 105, 106}, ce qui contribue au bon pronostic de ces tumeurs.

Jusqu'alors, beaucoup d'études ont rapporté l'expression de certains facteurs immuns (cytokines, chimiokines et de facteurs de croissance) dans les CCR, mais ces études se sont limitées à un nombre restreint de facteurs et le statut MMR des tumeurs est rarement pris en considération ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Une étude très récente a rapporté que le recrutement des cellules inflammatoires (lymphocytes T effecteur CD3+, cytotoxique CD8+, et mémoire CD45RO+) au niveau des tumeurs MSI serait réalisé grâce à l'expression de chimiokines spécifiques ¹¹⁰. Il a été également rapporté que l'intensité de la réponse immunitaire anti-tumorale est positivement corrélée à un bon pronostic dans les tumeurs colorectales d'une manière générale ^{111, 112, 113}. En revanche, aucune étude n'a encore clairement étudiée de manière concomitante l'impact de MSI et de l'immunité anti-tumorale chez les patients avec un CCR, même si ces phénomènes sont objectivement très intriqués ¹¹⁰.

2. Mutation de microsatellites présents dans la région non codante

D'après plusieurs publications, les séquences répétées présentes dans les régions non codantes intragéniques (introns, régions transcrites non traduites en 5' et 3') pourraient contribuer à la carcinogenèse MSI, en dérégulant l'expression des gènes qui les contiennent lorsqu'elles sont mutées dans l'ADN tumoral. Néanmoins, la fonction de telles répétitions est dans la plupart des cas inconnue. De rares exemples évoquant la possible implication de répétitions introniques dans la carcinogenèse MSI ont été rapportées, incluant nos travaux (cf. partie résultats de ce manuscrit), alors que d'autres rapportent la possible implication d'évènements affectant des microsatellites non codants des parties 5' ou 3' UTR de certains gènes.

**a. Répétition intronique située dans un site « atténuateur » de la transcription:
l'oncogène *MYB***

Une séquence répétée T₁₉ située dans l'intron 1 de l'oncogène *MYB* joue un rôle atténuateur dans le contrôle de l'élongation de la transcription de ce gène. Une surexpression de *MYB* a été observée dans les tumeurs MSI, probablement due à l'instabilité de cette répétition qui ne pourrait alors plus assurer son rôle ¹¹⁴. De manière intéressante, une forte expression de *MYB* a pu être associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CCR ¹¹⁵.

**b. Répétition intronique située à proximité d'un site accepteur d'épissage : *MRE11*
et *ATM***

L'instabilité d'une séquence répétée T₁₁ localisée en 3' de l'intron 4 du gène *MRE11*, à proximité du site accepteur d'épissage, a été associée à un épissage aberrant de ce gène de réparation donnant naissance à une protéine tronquée aberrante dans les cancers MSI ¹¹⁶. Ce défaut est corrélé à une diminution de l'expression du complexe MRN (*MRE11/RAD50/NBS1*) qui joue un rôle crucial dans la réponse cellulaire en cas de cassure double brin de l'ADN.

De la même façon, des séquences poly(T) située en amont des exons 8 et 22 du gène *ATM*, à proximité du site accepteur d'épissage, ont été retrouvées mutées dans des lignées de CCR MSI. Ces mutations sont associées à la formation de transcrits aberrants ¹¹⁷. Plus récemment, la mutation d'une séquence répétée T₁₅ localisée dans l'intron 5 du gène *ATM*, à proximité du site accepteur d'épissage, a été associée à un épissage aberrant donnant naissance à une protéine tronquée ayant perdue sa fonction dans les cancers gastriques MSI ¹¹⁸.

c. Répétitions introniques dans les régions 3'et 5' UTR

Par ailleurs, certaines répétitions non codantes situées dans les régions 5' et 3' transcrites et non traduites contribuent probablement à la régulation de l'expression génique. Il s'agit

en particulier de répétitions mononucléotidiques qui, dans certains cas, sont peu polymorphes et situées dans des zones de régulation de la stabilité des transcrits ou encore dans des régions promotrices¹¹⁹. Cette conservation peut être la conséquence d'une pression de sélection reflétant leur rôle fonctionnel dans l'expression génique. Mais il n'existe à ce jour aucune preuve fonctionnelle du rôle de l'instabilité de ces séquences dans le développement tumoral MSI.

Partie II : NMD ET CANCERS

I) Rôle du NMD :

Dans la cellule eucaryote, l'expression des gènes doit être maintenue avec un haut niveau de fidélité. Dans ce but, la cellule utilise plusieurs voies de dégradation de l'ARN pour éliminer les transcrits non fonctionnels ^{120, 121}. Au niveau de l'ARN messager, trois voies opèrent durant la traduction pour protéger la cellule d'une accumulation d'ARNm codant des protéines aberrantes. Il existe le NSD (pour Non-Stop Decay) ¹²², qui détecte et dégrade les ARNm n'ayant pas de codon stop, le NGD (pour No-Go Decay) ¹²³ qui cible les ARNm sur lesquels se sont arrêtés les ribosomes pendant la traduction probablement à cause d'une structure secondaire particulièrement complexe, et enfin le NMD (pour Nonsense-mediated mRNA Decay) qui dégrade les ARNm à codon stop prématuré ^{124, 125}.

Découvert il y a plus de 30 ans chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ¹²⁶, le NMD est un mécanisme de régulation post-transcriptionnel de l'expression des gènes, présent chez tous les eucaryotes, en charge de détecter et de dégrader les ARNm possédant dans leur séquence un codon stop prématuré (PTC, pour Premature Termination Codon) ¹²⁷. Il va permettre à la cellule de se prémunir des effets dominants négatifs et gain de fonction des protéines anormales tronquées générées par les ARNm présentant des PTC. Plusieurs études ont été menées afin de mieux comprendre le mécanisme de fonctionnement de ce système, ainsi que l'identification de ses composants clés (protéines UPF et SMG). Il est estimé qu'un tiers des mutations responsables des maladies génétiques ainsi que la majorité des cancers héréditaires surviennent suite à la synthèse de mutants avec un PTC ¹²⁸. La compréhension du fonctionnement du NMD a donc un intérêt double, tant fondamental que pour la compréhension de nombreux processus physiopathologiques dans lesquels il est susceptible d'intervenir, incluant le cancer. (Pour revue ¹²⁹).

1. Facteurs requis pour l'activité du NMD

Le système NMD fonctionne principalement grâce aux protéines UPF, mais d'autres facteurs sont également nécessaires dans le recrutement et la régulation des protéines UPF ainsi que dans l'activité du NMD (Table 6). (Pour revue¹²⁷).

Protéines	Étape dans le NMD	Localisation cellulaire
Protéines UPF		
UPF1	Facteur du NMD; pontage entre le PTC et l'EJC	Cytoplasmique, shuttles*
UPF2	Facteur du NMD; recruté à l'EJC par UPF3	Cytoplasmique
UPF3b (UPF3X)	Premier facteur du NMD associé à l'EJC; liaison du complexe UPF2 et Y14/MAGOH	Nucléaire, shuttles
UPF3a (UPF3)	Associé à l'EJC	Nucléaire, shuttles
Protéines SMG		
SMG1	Kinase de UPF1	Cytoplasmique
SMG5, SMG6 et SMG7	Impliquées dans la déphosphorylation de UPF1	Shuttles, cytoplasmique
Facteurs EJC		
Y14/MAGOH Hétérodimère	Composant de l'EJC; aiderait au recrutement de UPF1	Shuttling
RNPS1	Composant de l'EJC	Shuttles
eIF4AIII	Composant de l'EJC; liaison direct à la jonction exon-exon et fixation à Y14/MAGOH et BTZ	Nucléaire et cytoplasmique; shuttle
CASC3 (BTZ,MLN51)	Complexe avec eIF4AIII et Y14/MAGOH	Cytoplasmique
P29	Complexe ternaire avec Y14/MAGOH	Cytoplasmique

Table 6 : Protéines composants la machinerie du NMD.

* Navettes assurant le transport noyau-cytoplasme. D'après Holbrook JA et al., Nat Gen, 2004

a. Les protéines UPF : le corps de la machinerie NMD

Les protéines UPF1, UPF2 et UPF3 sont les principales régulatrices du NMD chez les eucaryotes.

UPF1 est une phosphoprotéine complexe composée de multiples domaines, recrutée sur l'ARNm à la fin de la traduction. Les extrémités N-Ter et C-Ter contiennent de multiples résidus sérine qui sont régulés par un cycle de phosphorylation et de déphosphorylation, indispensable pour l'activité du NMD (**Figure 9**). UPF1 possède deux domaines fonctionnels : l'un renfermant une activité hélicase 5'-3' ATP-dépendante et l'autre une activité ATPase ARN-dépendante.

UPF2 est une molécule adaptatrice reliant UPF1 à UPF3 pour induire le NMD. En accord avec son activité, UPF2 possède deux domaines d'interaction distincts pour UPF1 et UPF3. Le domaine de liaison à UPF1 se situe à la fois aux extrémités N-Ter et C-Ter. Le domaine d'interaction à UPF3 est situé à l'extrémité N-Ter.

Les cellules de mammifères possèdent 2 gènes codants pour UPF3 : *UPF3a* (ou *UPF3*) et *UPF3b* (ou *UPF3X*). Les deux protéines UPF3 ont des caractéristiques communes. Elles interagissent directement avec UPF2 *via* un domaine de liaison situé dans l'extrémité N-Ter. Ces deux protéines possèdent des motifs structuraux identiques, mais elles ont un degré d'activité différente dans le système NMD. UPF3b induit fortement le NMD alors que UPF3a n'a qu'une activité modérée. Cette différence d'activité serait expliquée par la présence d'un résidu arginine dans l'extrémité C-Ter de UPF3b, mais pas de UPF3a.

UPF3a et UPF3b sont recrutées sur l'ARNm lors de l'épissage dans le noyau (au niveau des complexes EJC), et sont transférées avec l'ARNm mature dans le cytoplasme. A son tour, UPF2 localisée dans la région périnucléaire va être recrutée par UPF3. Enfin, UPF1 localisée dans le cytoplasme sera recrutée sur l'ARNm sur les ribosomes et interagira ensuite avec UPF2.

b. Les protéines SMG : médiateurs du cycle de phosphorylation de UPF1

SMG-1, SMG-5, SMG-6 et SMG-7 sont impliquées dans le cycle de phosphorylation et déphosphorylation de UPF1. Ce cycle est requis pour l'activation du NMD ainsi que pour la régulation des interactions entre protéines recrutées sur l'ARNm.

SMG1 est une sérine-thréonine kinase, membre de la famille des phosphoinositide 3-kinases (PI3K). Elle phosphoryle UPF1 sur au moins quatre résidus sérine.

SMG-5, SMG-6 et SMG-7 sont trois protéines non redondantes qui induisent la déphosphorylation de UPF1. SMG-5 et SMG-7 forment un hétérodimère stable en interagissant avec leur domaine N-Ter, alors que SMG-6 agit de manière indépendante. Ces facteurs SMG ne sont pas des phosphatases mais induisent la déphosphorylation de UPF1 en recrutant la protéine phosphatase 2A (PP2A). Les protéines SMG se fixeraient sur UPF1 grâce à leur domaine 14-3-3, connu pour lier les résidus de sérines phosphorylées.

c. Les facteurs EJC

Le complexe EJC est un complexe multi-protéique (350kDa environ) dynamique, recruté sur l'ARNm au moment de l'épissage, à 20-24 nucléotides en 5' de chaque jonction exon-exon (après épissage de l'intron). Les composants de ce complexe changent au fur et à mesure que l'ARNm est traité dans le noyau, exporté dans le cytoplasme, puis traduit. Les protéines formant le noyau principal du complexe EJC sont: Y14, MAGOH (hétérodimère avec Y14, qui inhibe l'activité ATPase de eIF4III), CASC3 (appelée aussi BTZ ou MLN51, qui active l'activité hélicase de eIF4III) et eIF4AIII (ARN hélicase, protéine d'ancrage du EJC à l'ARNm), ainsi que UPF3. (Pour revue ¹²⁹).

2. Mécanismes moléculaires du NMD

a. Étape 1 : Détection

Les ARNm nouvellement synthétisés sont caractérisés par la présence du complexe CBC (pour Cap-Binding Complex), un hétérodimère des protéines CBP20 et CBP80, qui se fixe à la coiffe 5' des pré-ARNm déclenchant ainsi le début de l'épissage (**Figure 9**). Après le premier cycle de traduction, le complexe CBC sera remplacé par un autre facteur, eIF4E. De plus, les ARNm nouvellement synthétisés possèdent des complexes EJC en amont de chaque jonction exon-exon (à 20-24 nucléotides).

La détection d'un codon stop prématuré a lieu à la fin du premier cycle de traduction. La fin de ce premier cycle, impliquant les facteurs eRF1 et eRF3 (pour Ekaryotic Release Factor), correspond au premier signal nécessaire à l'activation du NMD (**Figure 9**). Si l'assemblage de ces deux facteurs sur le ribosome, arrêté sur le codon stop, a lieu à une distance \geq à 50-55 nucléotides en amont d'une jonction exon-exon, le ribosome sera dans l'incapacité d'enlever le complexe EJC suivant ; le deuxième signal est ainsi déclenché (**Figure 9**). Etant donné qu'un codon stop physiologique doit être localisé dans le dernier exon, la présence d'un complexe EJC en aval du codon de terminaison constitue une situation aberrante. UPF1 va interagir simultanément avec CBP80 (coiffe 5') et eRF3 (ribosome). UPF1 va ensuite s'associer avec SMG1 pour former le complexe SURF (pour SMG1, UPF1, eRF1 et eRF3) (**Figure 9**). A la suite de ce premier cycle de traduction, le complexe CBC va être remplacé par eIF4E. Il a d'ailleurs été démontré qu'après ce changement, le NMD devenait inefficace sur son substrat ARNm.

b. Étape 2 : Marquage de l'ARNm contenant un PTC

Après l'identification d'un ARNm contenant un PTC et avant sa destruction, des modifications protéiques ainsi que des réarrangements sont nécessaires.

Après la formation du complexe SURF dans l'étape 1, il va y avoir une association entre ce complexe SURF et UPF2-UPF3 localisés sur l'EJC, formant ainsi le complexe DECID (pour DECay-InDucing) (**Figure 9**). L'activité kinase de SMG-1 va être alors stimulée et induire la

phosphorylation de UPF1 aux extrémités C-Ter et N-Ter (**Figure 9**). La phosphorylation de UPF1 est une étape importante pour la répression de la traduction, requise afin que l'ARNm soit dégradé. UPF1 phosphorylé va interagir avec eIF3 (pour ekaryotic Initiation Factor 3), fixé au complexe ribosomal 43S sur le codon d'initiation de l'ARNm-PTC+. Cette interaction inhibe l'interaction avec la sous-unité 60S, pour former un ribosome 80S actif, pour l'initiation des prochains cycles de traduction.

c. Étape 3 : Destruction de l'ARNm à PTC

Les ARNm ornés de la protéine UPF1 phosphorylée (UPF1-P) vont tous être dégradés de façon similaire. Il existe deux voies de dégradation des ARNm-PTC+, via SMG6 avec son activité endonucléasique, ou via SMG5 et SMG7 provoquant un décoiffage et une déadénylation de l'ARNm (**Figure 9**).

UPF1-P va recruter la protéine SMG6, protéine possédant une activité endonucléase, et va déplacer UPF3 du complexe EJC. Le clivage endonucléolytique irréversible de SMG6 génère des produits de clivage 5' (qui comportent le PTC) et 3' (qui contiennent le complexe EJC ainsi que les différents facteurs du NMD). Les produits de clivage 5' sont sujets à une dégradation 3'-5' par l'exosome, complexe protéique capable de dégrader les différents types d'ARN. Avant que les produits de clivage 3' puissent être dégradés, les différents composés protéiques doivent être déplacés grâce à l'activité hélicase de UPF1, permettant ainsi le désassemblage des protéines, le recyclage des facteurs du NMD puis la dégradation 5'-3' par des exonucléases du fragment 3' de l'ARNm.

UPF1-P va également recruter les protéines SMG5 et SMG7 et induire le décoiffage de l'ARNm suivi d'une dégradation par des 5'-3' exonucléases et/ou la déadénylation de l'ARNm suivie d'une dégradation par des 3'-5' exonucléases.

d. Étape 4 : Evènements post-destruction de l'ARNm

Après la destruction de l'ARNm, les facteurs du NMD doivent être recyclés pour d'autres cycles de dégradation d'ARNm-PTC+. Comme il a été cité précédemment, l'activité hélicase de UPF1 va permettre le désassemblage des composants du NMD. UPF1 lui-

même doit retourner dans son état hypophosphorylé. Cette étape va être accomplie par la protéine PP2A, recrutée par SMG5 et SMG7. Cette étape est très importante, car une défaillance dans le recrutement de PP2A conduit à une inhibition du NMD.

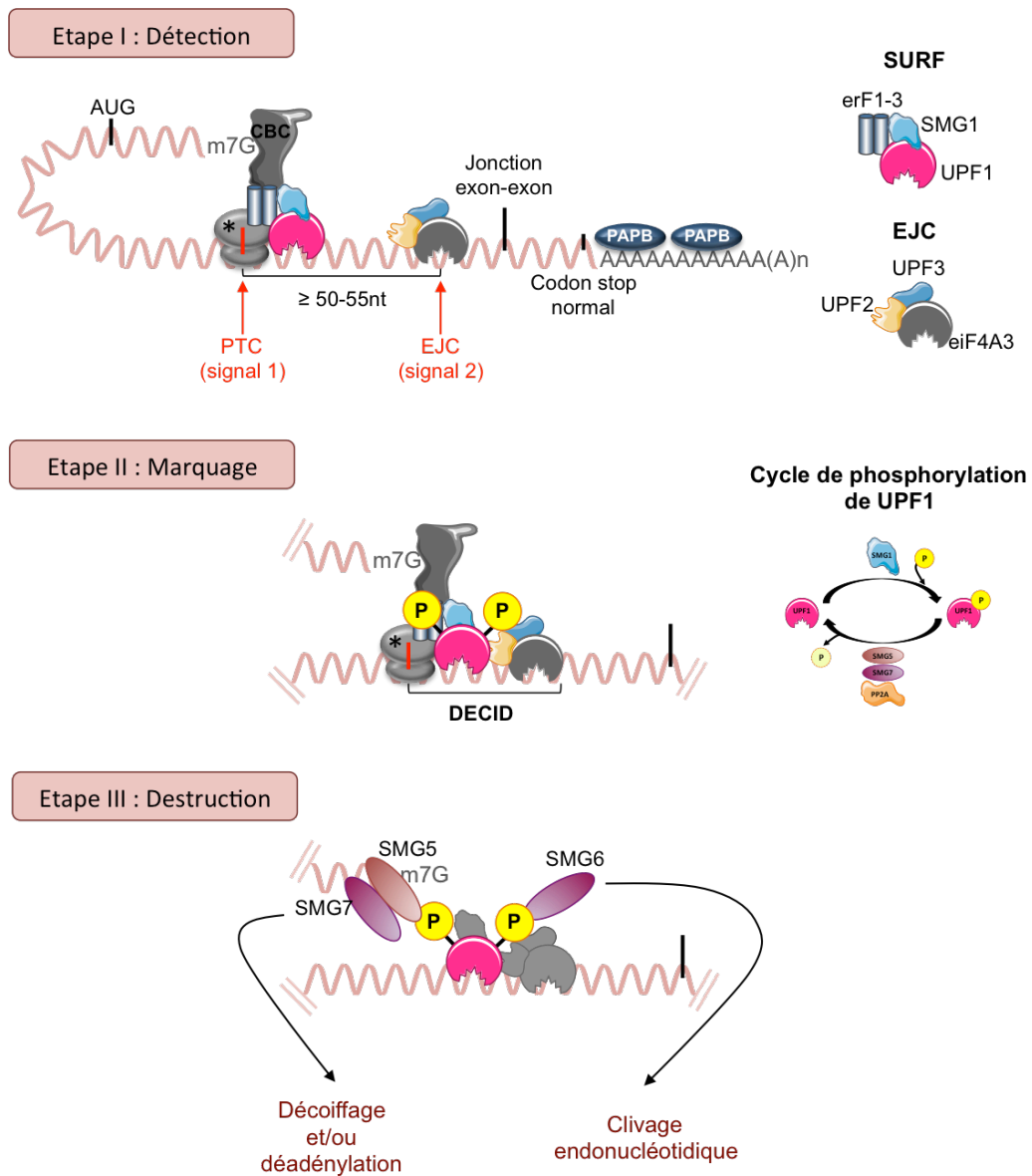


Figure 9 : Mécanisme moléculaire du NMD.

D'après Durand S et al., Cell, 2011 et Wei-Lin Popp et al., Annu Rev Genet, 2013.

II) NMD et carcinogenèse

a. NMD et sa nature *Jekyll and Hyde*

L'importance clinique du NMD a été appréciée pour la première fois dans la β -thalassémie¹³⁰. Dans quelques cas, la dégradation de l'ARNm-PTC+ évite un effet dominant négatif de la protéine tronquée, réduisant ainsi la sévérité de la maladie. Le NMD a en conséquence été décrit comme protecteur vis à vis de la β -thalassémie¹³¹. Un autre exemple du rôle protecteur du système NMD est son effet sur la dégradation des ARNm muté COL1A1 et COL1A2 codant pour les chaînes alpha1 et alpha2 du collagène de type 1 dans l'ostéogenèse imparfaite^{132, 133}. Dans d'autres cas, le NMD va dégrader au contraire un ARNm-PTC dont la protéine tronquée a conservé une fonction sauvage résiduelle, causant ainsi un phénotype plus sévère. L'effet délétère du NMD a été décrit notamment dans la dystrophie musculaire de Duchenne¹³⁴ et la maladie d'Ulrich¹³⁵.

Dans les cancers, le rôle du NMD est également complexe, et il peut revêtir aussi bien un effet bénéfique qu'un effet néfaste, dépendant de la nature de la mutation et de la maladie par elle même. Cette nature *Jekyll and Hyde* a été néanmoins surtout documentée par plusieurs études étudiant l'effet du NMD vis à vis de cancers héréditaires^{128, 136, 137}. Son rôle est alors avant tout décrit vis à vis de mutations germinales prédisposant à des pathologies tumorales.

Dans le gène *BRCA1* par exemple, de nombreuses mutations germinales induisant la formation d'un ARNm-PTC+ sont générées et sont à l'origine de cas familiaux de cancers du sein et de l'ovaire. Les mutations tronquantes des régions centrales de *BRCA1* (reconnue par le NMD) sont associées à un faible risque de cancer du sein¹³⁸. La dégradation des transcrits mutants dans le contexte est protectrice puisque la protéine tronquée confère une certaine chimiorésistance, diminue la sensibilité à l'apoptose, et empêche le rôle de suppresseur de tumeur de l'allèle sauvage (effet dominant négatif). En dégradant l'ARNm codant cette protéine tronquée dominante négative, le NMD a donc un effet anti-tumoral. Cependant, les deux mutations les plus communes de *BRCA1* échappent à cet effet protecteur du NMD car elles génèrent des PTC dans des régions où

le NMD est incompetent, c'est-à-dire dans le dernier exon. La protéine mutante est alors produite à haut niveau et peut de manière constitutive agir avec un effet délétère présumé¹³⁸.

Dans le cas des FAP (polypose adénomateuse familiale), de nombreuses mutations tronquantes sont localisées dans le dernier exon du gène *APC* et génèrent des protéines dont la fonction est réduite mais partiellement conservée¹³⁹. Certaines de ces mutations sont associées à un phénotype atténué de polypose¹⁴⁰.

Les mutations de *CDH1* dans les cancers gastriques héréditaires diffus (HDGC), aboutissant à la formation d'un ARNm-PTC+ reconnu par le NMD, conduisent au développement de cancers gastriques à un âge plus précoce, comparativement aux mutations non reconnues par le NMD^{141, 142}. Ces observations indiquent que les protéines tronquées en partie C-Ter, non dégradées par le NMD, conservent une certaine activité sauvage.

Toutes ces observations montrent donc bien les effets contrastés des mutations non-sens, des protéines tronquées et du NMD sur la présentation clinique des patients atteints de cancers et le fait que cela soit fonction du contexte cellulaire et tissulaire ainsi que de la fonction de chaque protéine (**Figure 10**). Généralement, les gènes suppresseurs de tumeur ont un nombre important de mutations non-sens qui seraient des cibles du NMD aboutissant à un faible niveau de ces protéines¹⁴³. En revanche, de nombreuses mutations d'oncogènes sont des mutations faux-sens, qui ne sont pas reconnus par le NMD permettant ainsi une forte expression de ces oncoprotéines¹⁴³.

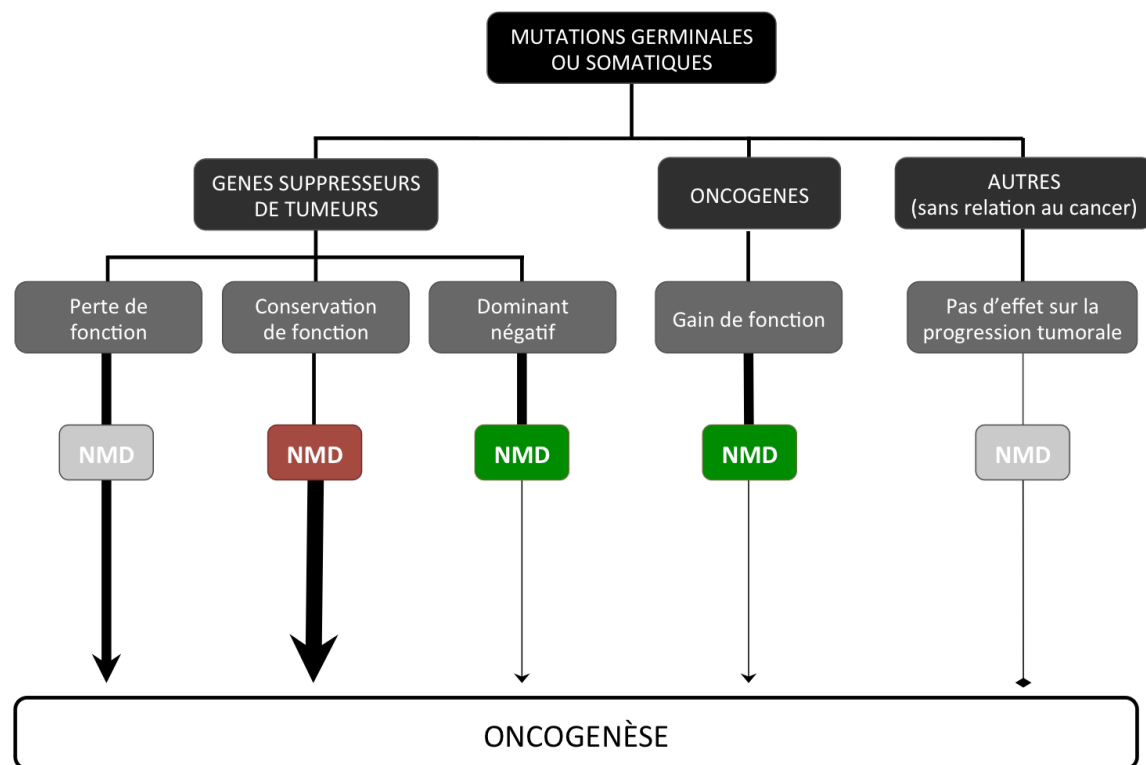


Figure 10 : Impact du NMD sur l'oncogénèse.

La dégradation des transcrits mutés peut avoir un effet pro-oncogénique (cadre rouge), anti-oncogénique (cadre vert) ou aucun d'effet (cadre gris). D'après El-Bchiri et al., HMG, 2005.

Un niveau supplémentaire de complexité est atteint par le changement de niveau d'expression d'un vaste répertoire de transcrits dit « normaux » qui sont ciblés par le NMD dans les cellules tumorales ¹⁴⁴. Ces cibles ont été identifiées dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome suite à une inhibition du NMD. De façon très intéressante, les ARNm surexprimés sont ceux qui codent pour des protéines promouvant la tumorigénèse et incluant ATF4, requis pour la croissance tumorale ¹⁴⁵, des protéines impliquées dans le métabolisme d'acides aminés, une voie importante dans la progression tumorale ^{146, 147}. Plusieurs de ces transcrits cibles ont été montrés comme surexprimés dans des lymphomes de Burkitt, des mélanomes, des cancers du sein et de la prostate. De plus, il semblerait que l'inhibition du NMD favorise la croissance tumorale dans certains cancers ¹⁴⁴. Toutes ces études réunies suggèrent qu'une inhibition du NMD par le microenvironnement tumoral pourrait être un mécanisme important dans la régulation de gènes critiques pour la tumorigénèse. Très récemment, une étude a rapporté que les carcinomes adéno-squameux du pancréas arboraient une mutation somatique fréquente du gène *UPF1*, inhibant ainsi le NMD et aboutissant à une surexpression des ARNm cibles

dans ces cancers ¹⁴⁸. De manière très intéressante, cette mutation semble être associée à un pronostic très mauvais chez les malades.

b. NMD et carcinogenèse MSI

Peu de choses ont été décrites sur l'activité du NMD dans les tumeurs MSI jusqu'à lors. Plusieurs études ont cherché à identifier de nouveaux gènes cibles mutés avec un PTC et potentiellement impliqués dans la tumorigenèse MSI, en bloquant le système NMD. En 2001, une stratégie appelée GINI (pour Gene Identification by NMD Inhibition) a été proposée pour l'identification de gènes contenant des mutations non-sens ¹⁴⁹. Par cette approche, Ionov *et al.* ont identifié deux nouveaux gènes par des analyses microarray, *UVRAG* et *p300*, surexprimés suite à un traitement émétine et actinomycine D de deux lignées cellulaires MSI ¹⁵⁰. Cependant, le traitement utilisé dans cette stratégie n'inhibe pas spécifiquement le système NMD et sur les 2500 gènes en relation avec le cancer analysés, seul deux nouveaux gènes mutants ont été identifiés. En 2007, cette même équipe a publié de nouveaux gènes cibles de MSI en utilisant une stratégie GINI modifiée, par l'ajout d'un inhibiteur de la phosphorylation de UPF1 ¹⁵¹.

Mon laboratoire d'accueil a également investigué le rôle putatif du système NMD dans les cancers MSI, vu le nombre important de mutants PTC+ générés dans ces tumeurs. Les auteurs ont rapportés que l'activité de ce système était en effet contributive d'une modification importante de l'expression de gènes cibles dans ces tumeurs ¹⁵². Dans une seconde étude, ils ont investigué le changement d'expression d'un très grand nombre de gènes *via* l'utilisation de puces microarray, avant et après inhibition du NMD dans un modèle cellulaire MSI ⁹². Ces données indiquent que le système NMD module l'expression de nombreux gènes dont les mutations ont déjà été rapportées (*TGFBR2*, *MSH3*, *MBD4*) ou sont attendues pour jouer un rôle dans la tumorigenèse MSI ⁸⁵. Par cette approche, quatre nouveaux gènes cibles mutants ont été découverts dans les CCR MSI (*SLC35F5*, *TTC3*, *ARV1* et *SMAP1*). Dernièrement, quatre autres nouveaux gènes cibles ont été rapportés comme fréquemment mutés dans les CCR MSI avec une approche similaire (*MLL3*, *PHACTR4*, *RUFY2*, *TBCD1D23*) ¹⁵³.

L'activité du NMD sur l'immunité anti-tumorale dans les tumeurs MSI a également été investiguée⁹². Une corrélation inverse entre l'expression de UPF1 et UPF2 et le nombre de cellules TIL-CD3 a été observée dans les CCR MSI. Ces données suggèrent que le NMD pourrait impacter négativement l'immunité de l'hôte contre les cellules tumorales MSI en diminuant l'expression de nombreux mutants immunogènes et leur expression à la membrane en conséquence dans les tumeurs. En 2008, il a été rapporté que UPF1 était significativement surexprimé dans les CCR MSI comparativement aux muqueuses normales et aux CCR MSS, suggérant un rôle et une activité importante du NMD, potentiellement oncogénique, dans ce type de cancer du côlon⁹².

D'après toutes ces données, on constate donc que le système NMD génère des modifications importantes du transcriptome tumoral MSI avec un effet potentiellement oncogénique, en particulier du fait de son impact négatif sur l'immunité anti-tumorale de l'hôte. D'autres études ont également rapporté que l'inhibition spécifique de ce système pourrait être d'intérêt thérapeutique pour un traitement spécifique des tumeurs MSI, en induisant ainsi une immunité anti-tumorale^{154, 155, 156}.

Partie III : LES PROTEINES HSP

Les protéines de stress ou protéines de choc thermique (HSP pour Heat Shock Protein) ont été découvertes en 1962 chez la drosophile ¹⁵⁷, puis dans d'autres organismes cellulaires ¹⁵⁸. Il s'agit d'une famille de protéines hautement conservée, dont l'expression est induite par différents types de stress. Il a été montré par la suite que la plupart des HSP avait de véritables effets cytoprotecteurs et se comportait comme des chaperonnes moléculaires pour d'autres protéines cellulaires.

Les protéines HSP sont codées par des familles distinctes de gènes et sont classées en accord avec leur poids moléculaire, exprimé en kiloDaltons (kDa). Les différentes familles de protéines HSP sont : (1) les petites HSP (HSP27), (2) famille HSP40, (3) famille HSP60, (4) famille HSP70, (5) famille HSP90 et (6) famille HSP110 (**Table 7**). Plus récemment, une nouvelle nomenclature de ces protéines a été proposée ¹⁵⁹. Celle-ci est basée sur le symbole des gènes assigné par le HGNC (pour HUGO Gene Nomenclature Committee) et leurs identifications dans les bases de données *Entrez Gene* et *Ensembl* : HSPB (pour la famille des petites HSP), DNAJ (pour la famille HSP40), HSPD (pour la famille HSP60), HSPA (pour la famille HSP70), HSPC (pour la famille HSP90) et enfin HSPH (pour la famille HSP110). Dans ce manuscrit, j'utiliserai la nomenclature classique présente encore dans de très nombreuses publications.

Chaque famille d'HSP est composée de membres exprimés de façon constitutive ou inductible suite à un stress (choc thermique, stress oxydatif, drogue anti-cancéreuse). Les protéines de haut poids moléculaire sont des chaperonnes ATP-dépendantes alors que les petites HSP sont ATP-indépendantes (**Table 7**). Les fonctions principales attribuées aux protéines chaperonnes sont : (1) l'import de protéines dans les différents compartiments cellulaires, (2) le repliement de protéines dans le cytosol, le réticulum endoplasmique ou encore la mitochondrie, (3) la dégradation des protéines instables, (4) la dissolution de complexes protéiques, (5) la prévention de l'agrégation protéique (**Figure 11**).

Protéine (ancienne nomenclature)	Protéine (nouvelle nomenclature)	Localisation	ATP- dépendant
Famille des petites HSP ou HSPB (11 membres)			
HSP27	HSPB1	Cytosol	Non
α A-crystalline	HSPB4	Cytosol	Non
α B-crystalline	HSPB5	Cytosol	Non
Famille des chaperonins (14 membres)			
HSP10	HSPE1	Mitochondrie	/
HSP60	HSPD1	Mitochondrie	Oui
Famille HSP40 ou DNAJ (50 membres)			
Sous famille DNAJA (4 membres)			
Sous famille DNAJB (14 membres)			
HSP40	DNAJB1	Cytosol	Non
Sous famille DNAJC (22 membres)			
Famille HSP70 ou HSPA (13 membres)			
HSP70-1	HSPA1A	Cytosol et noyau	Oui
HSP70-2	HSPA1B	Cytosol et noyau	Oui
HSC70	HSPA8	Cytosol et noyau	Oui
GRP75	HSPA9	Mitochondrie	Oui
Famille HSP90 ou HSPC (5 membres)			
HSP90 α	HSPC2	Cytosol	Oui
HSP90 β	HSPC3	Cytosol	Oui
GRP94	HSPC4	Réticulum endoplasmique	Oui
Famille HSP110 ou HSPH (4 membres)			
HSP110	HSPH1	Cytosol et noyau	Oui

Table 7 : Liste des différentes familles de protéines HSP.

Pour chaque famille, seule les protéines les plus étudiées ont été intégrées dans la table. *D'après Kampinga et al., Cell Stress Chaperonne, 2009.*

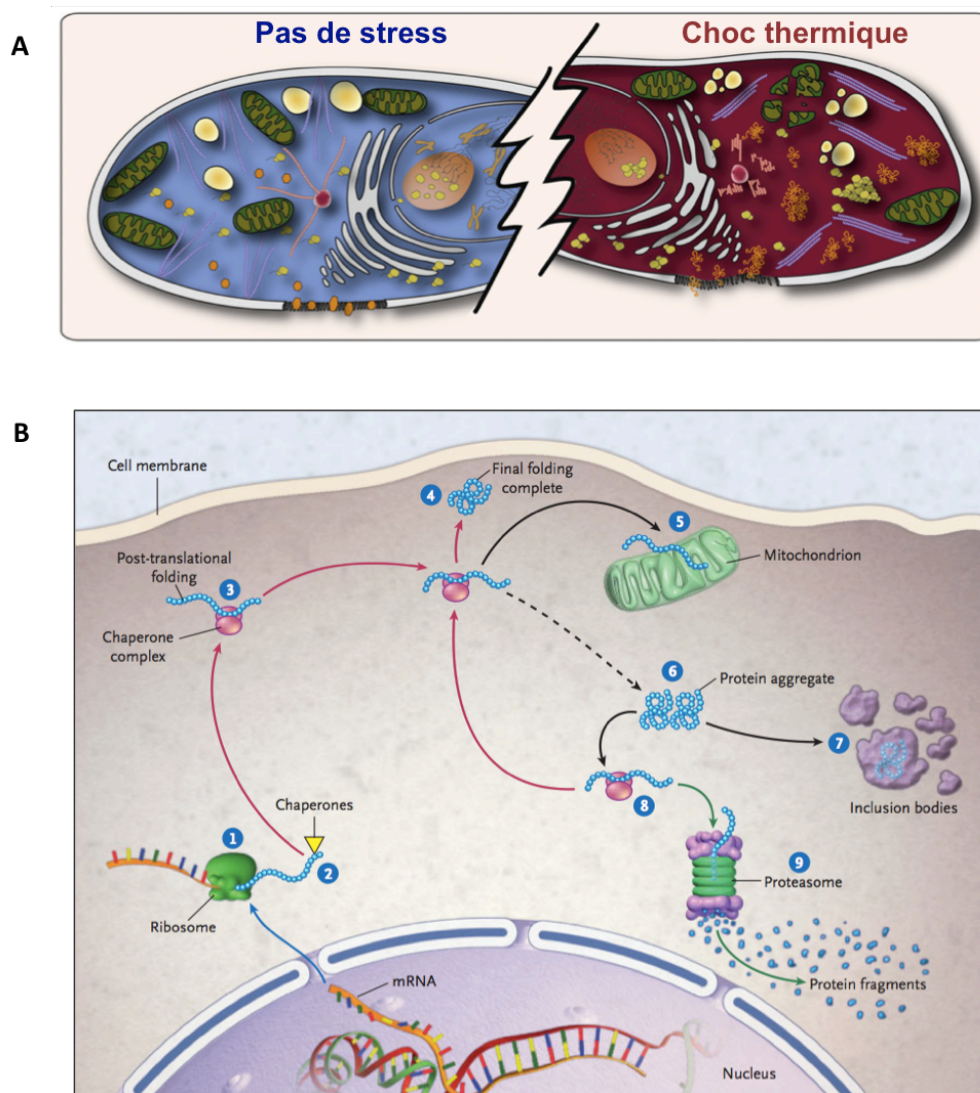


Figure 11 : Rôle des protéines HSP dans la cellule normale

A) Effet d'un choc thermique sur l'organisation d'une cellule eucaryote. Après un choc thermique, on observe des dommages au niveau du cytosquelette (filament d'actine en bleu et microtubule en rouge); l'appareil de golgi et le réticulum endoplasmique (blanc) sont fragmentés et désassemblés. Le nombre et l'intégrité des mitochondries (vert) et des lysosomes (gradient blanc-jaune) diminuent. Dans le nucléole, site d'assemblage des ribosomes (jaune), on observe de gros dépôts granulaire correspondant aux protéines ribosomales. On trouve également dans le cytosol des agrégats ARN-protéines en plus des agrégats protéiques (jaune et orange), ainsi que des changements morphologiques de la membrane. Tous ces effets stoppent la croissance cellulaire et mènent à un arrêt du cycle cellulaire. *D'après Richter et al., Molecular Cell, 2010.*

B) Schéma représentant la vie d'une protéine et le rôle des protéines chaperonnes. 1) Traduction d'un ARNm par le ribosome. 2) Repliement de la protéine naissante à l'aide de chaperonne. 3-4) Repliement post-traductionnel de la protéine dans sa structure tertiaire. 5) Transport de protéine dans les organelles. 6-7) Formation d'agrégats protéiques et précipitation dans des corps d'inclusion. 8) Libération de protéines des agrégats protéique par les chaperonnes 4) nouveau repliement ou 9) dégradation par le protéasome. *D'après Macario et al., NEJM, 2005*

I) Protéines chaperonnes et cancer

De nombreuses études indiquent aujourd'hui que toutes les propriétés des protéines HSP sont exploitées durant la progression tumorale, lorsque ces protéines sont exprimées à des hauts niveaux facilitant ainsi la croissance et la survie de la cellule tumorale ¹⁶⁰. Une augmentation de l'expression des protéines HSP est observée aussi bien pendant le développement tumoral qu'au cours de l'acquisition d'une résistance aux différents agents de chimiothérapies. (Pour revue ^{161, 162, 163}).

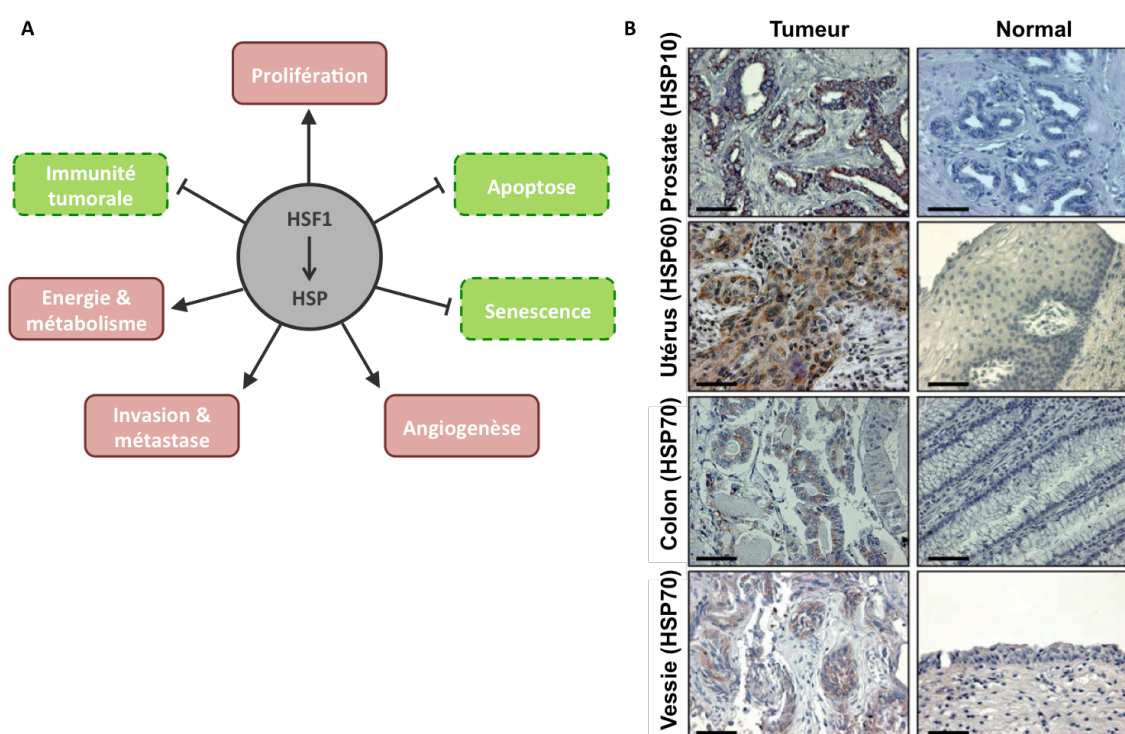


Figure 12 : Surexpression des HSP dans les cancers.

A) Impact des protéines HSP sur les différentes voies tumorigéniques. D'après Ciocca et al., Arch Toxicol, 2013.

B) Surexpression des protéines HSP dans les cancers. D'après Rappa et al., Anticancer Research, 2012.

1. Rôle des protéines HSP dans les cancers

Ces vingt dernières années, de nombreuses publications ont rapporté l'implication des protéines chaperonnes dans des mécanismes métaboliques et moléculaires divers au sein des cellules cancéreuses (**Figure 12**) ¹⁶⁴. Au vu de ces différentes propriétés, les

chaperonnes sont plutôt bénéfiques pour les cellules cancéreuses et par conséquent perçues d'une manière générale comme des protéines dont la fonction est oncogénique.

Ces protéines chaperonnes sont notamment impliquées dans tumorigenèse *via* une inhibition des voies apoptotiques ^{165,166}.

L'apoptose peut être induite par deux voies, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. Dans la voie intrinsèque, les signaux de mort cellulaire vont induire la libération du cytochrome C dans le cytosol *via* la mitochondrie, lequel va interagir avec APAF-1 (pour Apoptosis Protease-Activating Factor-1) et la pro-caspase 9 pour former l'apoptosome, un complexe actif qui induit l'activation de caspases en cascade menant à l'apoptose. HSP27, HSP70 et HSP90 vont interférer avec l'apoptose en inhibant la formation de l'apoptosome ^{167,168}. HSP90 serait également en mesure d'inhiber ASK1 (pour Apoptosis Signal Regulating Kinase 1), une kinase pro-apoptotique ¹⁶⁹. Dans la voie extrinsèque, l'apoptose est déclenchée *via* l'activation de récepteurs de mort cellulaire après liaison à leur ligand. HSP27 et HSP70 sont en mesure d'inhiber l'apoptose en agissant au niveau de ces récepteurs ¹⁷⁰. En revanche, HSP90 va favoriser l'apoptose en stabilisant la liaison entre le récepteur TNFR1 (pour Tumor Necrosis Factor Receptor 1) et son ligand ¹⁷⁰.

Une augmentation des protéines HSP semble également être impliquée dans des phénomènes de résistance à la sénescence ^{171, 172}. Pour échapper à la sénescence et avoir un nombre illimité de division, la cellule tumorale doit-être en mesure d'outrepasser entre autre un système de contrôle de l'âge cellulaire, régulé notamment par la longueur des télomères. HSP90 serait essentielle dans la stabilité des télomérases, ce qui pourrait expliquer le rôle important de cette protéine dans ce processus et son rôle dans la transformation des cellules ¹⁷³.

Pour améliorer son apport en oxygène, la tumeur est capable de mettre en place une angiogenèse *de novo*. Les protéines HSP jouent un rôle important dans ce procédé *via* le facteur de transcription HIF1 α (pour Hypoxia Inducible Factor). L'activité de ce facteur est régulée par son niveau de stabilité protéique, et une augmentation des protéines HSP70 et HSP90 est nécessaire pour favoriser sa stabilisation et son accumulation ¹⁷⁴, ce qui est le cas dans les cellules cancéreuses. En amont de HIF1 α , d'autres facteurs régulent la

prolifération et la mobilité des cellules endothéliales vasculaires dont le facteur de croissance VEGF (pour Vascular Endothelial Growth Factor) et l'enzyme NOS (pour Nitric Oxide Synthase) requièrent HSP90 pour leur induction et stabilité^{175, 176, 177}. Le rôle crucial d'HSP90 est démontré par le fait que l'angiogenèse tumorale est améliorée quand HSP90 est surexprimée, et inhibée par des drogues ciblant HSP90^{176, 177, 178}. La protéine HSP27 servirait également de médiateur dans la mobilité des cellules endothéliales et leur prolifération¹⁷⁹.

Les tumeurs qui surexpriment les protéines HSP ainsi que le facteur de transcription HSF1 (pour Heat Shock transcription Factor 1) auraient tendance à envahir le microenvironnement tumoral et à s'étendre aux organes à distance, mais le mécanisme impliqué n'est pas encore très clair^{160, 161}. Des travaux ont démontré qu'HSP90 jouerait un rôle dans la migration, l'invasion ainsi que la formation de métastase des cellules tumorales^{180, 181} et que son inhibition semblait réduire l'invasion des cellules tumorales^{182, 183, 184}. De plus, une corrélation positive a été trouvée entre la surexpression d'HSP27 et HSP70 et l'invasion tumorale^{160, 185}.

Le niveau d'expression des HSP est altéré dans les cellules cancéreuses, avec principalement un niveau d'expression augmenté dans une grande variété de tumeurs en comparaison aux cellules non transformées pour un tissu donné (**Figure 12**). (Pour revue¹⁶¹).

Plusieurs mécanismes sont proposés. Suite à un choc thermique, une augmentation massive de l'expression des gènes HSP est observée suite à l'interaction du facteur de transcription HSF1 avec les éléments HSE (pour Heat Shock regulatory Elements) présents sur les promoteurs de tous les gènes *HSP*^{186, 187}. La chaperonne HSP90 est un régulateur intrinsèque de ce facteur de transcription en l'absence de stress. Une augmentation de l'utilisation d'HSP90 par les protéines tumorales mutées instables semble être suivie d'une dé-répression de HSF1, induisant ainsi une augmentation de la transcription des gènes *HSP*¹⁸⁸. Il a également été récemment démontré que dans les cancers du sein, le facteur tumorigénique HRGβ1 (pour Héréguline- β1) induisait une augmentation de l'expression des protéines HSP en permettant une stabilisation du facteur HSF1¹⁸⁹. Un autre

mécanisme de régulation des protéines HSP dans les cellules normales implique le gène suppresseur de tumeur *p53*, gène contrôlant la prolifération cellulaire. Ce gène réprime la transcription des gènes *HSP* en se liant à leur promoteur ¹⁹⁰. Durant la transformation, la mutation de *p53* est très fréquente (45% des cancers) ce qui provoque une augmentation de la transcription d'*HSP70* ^{191, 192}.

Il semblerait que les hauts niveaux d'HSP corrélerent avec le pronostic de plusieurs tumeurs. Une surexpression d'HSP27 est associée à un mauvais pronostic dans les cancers de l'ovaire par exemple ¹⁹³, au même titre que HSP60 dans les carcinomes du côlon ¹⁹⁴ et de la prostate ¹⁹⁵. L'impact d'une forte expression d'HSP70 sur le pronostic va dépendre du site tumoral. Elle est associée à un mauvais pronostic des cancers de l'endomètre ¹⁹⁶ et du sein ¹⁹⁷, en revanche il n'y a pas de corrélation entre son expression et le pronostic des cancers gastriques ¹⁹⁸. HSP90 est associée à un mauvais pronostic dans les cancers du sein infiltrant (cancers invasifs canaux) ¹⁹⁹, mais à un bon pronostic dans les cancers de l'endomètre ¹⁹⁶.

2. Protéines HSP dans les cancers colorectaux

Les protéines HSP sont également surexprimées dans les cancers colorectaux. Le premier article faisant état d'une forte expression anormale d'HSP60 dans une pathologie humaine a été écrit pour le cancer colique ²⁰⁰. Cette étude pionnière indique une surexpression coordonnée d'HSP60 et HSP110 dans les événements précoces de la carcinogenèse et que ces chaperonnes pourraient y jouer différents rôles, comparativement aux cellules normales. D'autres études ont rapporté par la suite cette surexpression dans les CCR, et le rôle potentiel d'HSP60 en temps que marqueur diagnostique ^{201, 202}.

Les chaperonnes HSP27 et HSP70 ont également été rapportées comme étant surexprimées dans les CCR et associées à un mauvais pronostic de ces cancers ^{203, 204, 205}. D'après une étude, l'expression d'HSP70 serait significativement plus forte dans les CCR faiblement différenciés avec métastase que dans les cancers plus différenciés sans métastase ²⁰⁶. De plus cette surexpression pourrait également être utilisée comme marqueur de pronostic pour ces cancers de stade I et II ²⁰³.

En 2005, une équipe a investigué plus spécifiquement l'impact de la chaperonne HSP70 dans les cancers colorectaux MSI ²⁰⁷. Ils se sont intéressés au fait que ces cancers soient de meilleur pronostic et qu'ils soient caractérisés par une forte réponse immunitaire de l'hôte. Ils décrivent, à partir d'approches de puces à ADN et de RT-PCR quantitative, que les CCR MSI ont une expression significativement plus forte d'HSP70 que les CCR MSS ²⁰⁸. De façon surprenante, par des analyses statistiques multivariées, ils constatent qu'une absence ou une faible expression d'HSP70 est associée de façon indépendante à une mauvaise survie. HSP70 aurait un rôle dans la réponse immunitaire anti-tumorale, notamment dans la prise en charge de peptides par les CPA (pour Cellule Présentatrice d'Antigène) ²⁰⁹. Comme il a été décrit précédemment, au vu du nombre important de mutations dans les microsatellites, les cancers MSI produisent des protéines tronquées ayant une extrémité C-Terminale aberrante qui peuvent posséder des propriétés néo-antigéniques. D'après Banerjea A *et al.*, la surexpression d'HSP70 dans les cancers MSI pourrait être essentielle afin que ces tumeurs présentent des stigmates d'hyper immunogénicité ²⁰⁷.

Il en est de même pour HSP90 où deux études récentes se contredisent quand à son impact sur la survie des patients. Une étude de 2014 rapportent qu'une forte expression d'HSP90 serait corrélée à une meilleur survie des patients, cependant cette étude a été réalisé par marquage immunohistochimique, qui n'est pas une technique quantitative ²¹⁰. En revanche une étude de 2011 rapporte qu'une surexpression des ARNm d'HSP90 α est associée à une faible survie des CCR ²¹¹.

L'impact de ces chaperonnes sur le pronostic et la survie des patients atteints de CCR n'est donc pas encore très claire à l'heure actuelle. De plus, peu d'études ont pris en compte le phénotype MSI des CCR comme d'autres critères lors de la réalisation de ces analyses de survie et il faut désormais envisager la réalisation d'analyses multivariées.

3. Thérapie : des inhibiteurs de chaperonne

L'utilisation d'inhibiteurs d'HSP90, HSP70 et HSP27 est une stratégie émergente dans le cadre de thérapie anti-cancéreuse. Ces inhibiteurs ont pour principal mécanisme d'aller se lier à la protéine chaperonne, inhibant ainsi son activité.

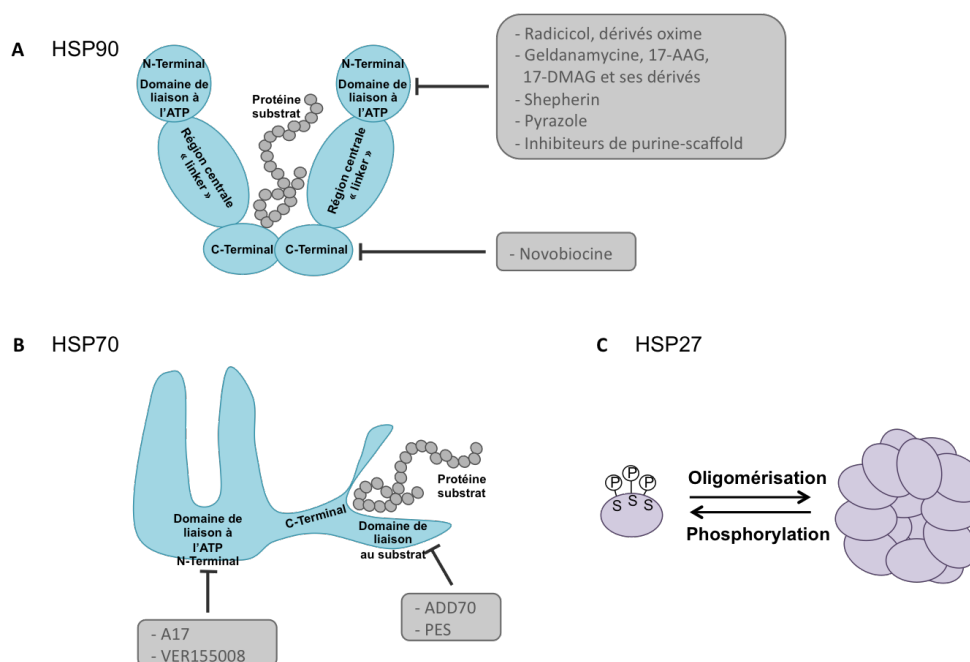


Figure 13 : Représentation schématique d'HSP90, HSP70 et HSP27. Sites de fixation des inhibiteurs.
Sites de liaison des inhibiteurs pour les protéines HSP90 et HSP70. Le niveau d'oligomérisation d'HSP27 dépend de son statut de phosphorylation. D'après Jeco et al., *Cancer Letters*, 2013.

La protéine HSP90 possède au niveau de sa structure protéique trois domaines relevant qui vont être la cible des inhibiteurs : (1) le domaine N-Ter responsable de l'activité ATPasique de la protéine, (2) la région centrale appelée *linker* ayant une grande affinité pour les co-chaperonnes et (3) le domaine C-Ter régulant l'activité ATPase d'HSP90 (**Figure 13**). Basées sur l'ATP-dépendance de la chaperonne HSP90, les drogues qui interagissent avec les domaines de liaison à l'ATP ont été testé pour leur capacité à inactiver l'activité de la chaperonne (**Figure 13**). La première génération d'inhibiteurs a montré un niveau de toxicité élevé chez les patients atteints de cancers (Geldanamycine). La deuxième génération, qui nécessitait également une administration en intraveineuse hebdomadaire, était moins toxique (17-AAG). La troisième génération d'inhibiteur prise oralement, serait

moins toxique et aurait de meilleures propriétés anticancéreuses. Jusqu'à aujourd'hui, 17 inhibiteurs ont été testés dans des essais cliniques mais n'ont pas reçu l'approbation de la FDA (pour Food and Drug Administration) ²¹². Les raisons de ce manque de succès sont multiples, essentiellement liés à des problèmes de toxicité, de résistance à la drogue et un effet anti-tumoral limité. Une des explications possibles est que les inhibiteurs d'HSP90 augmentent l'expression d'HSP70. Une combinaison d'inhibiteurs d'HSP90 et HSP70 pourrait être une approche intéressante. L'administration d'inhibiteurs d'HSP90 en combinaison avec d'autres chimiothérapies peut également être prometteur, comme par exemple, l'utilisation combinée de geldanamycine et bortezomib pour l'inhibition respective de HSP90 et du protéasome dans le cas de myélomes multiples ^{213, 214}.

L'inhibition d'HSP70 est également une thérapie anti-cancéreuse prometteuse, plusieurs études ayant démontré que l'inhibition de ce gène par ARN-interférence aurait un rôle important dans la croissance et la survie de cellules cancéreuses ²¹⁵. La protéine HSP70 possède deux régions fonctionnelles distinctes : (1) un domaine de liaison à l'ATP en N-Ter et (2) un domaine de liaison au substrat en C-Ter. De même que pour HSP90, les inhibiteurs d'HSP70 vont cibler l'un de ses domaines en particulier (**Figure 13**). Seulement quelques études ont identifié avec succès des drogues ayant la capacité d'inhiber l'activité pro-cancéreuse d'HSP70. Ces études supportent clairement l'idée que, en plus de cibler HSP90, l'inhibition d'HSP70 est une nouvelle approche thérapeutique intéressante.

HSP27 est également une cible intéressante dans la thérapie anti-cancéreuse. Cependant la complexité structurale de cette molécule augmente le challenge dans la recherche de molécules thérapeutiques qui peuvent neutraliser HSP27. Les petits et les grands oligomères d'HSP27 sont dans un équilibre dynamique, modulé par la phosphorylation de cette protéine (**Figure 13**). Depuis que différentes fonctions ont été attribué aux petits ou grands oligomères d'HSP27, il serait intéressant de pouvoir obtenir des molécules qui ciblent spécifiquement la forme phosphorylé ou non.

II) La protéine chaperonne HSP110

La protéine HSP110 est une chaperonne très conservée et abondante dont l'expression est induite par différentes conditions spécifiques de stress. Comme les autres protéines HSP inductibles, HSP110 protège les cellules contre des conditions particulières qui lui sont défavorables. Cependant, son rôle dans les cellules eucaryotes est encore peu décrit.

1. Structure de la protéine HSP110

D'un point de vue structural, HSP110 a une organisation protéique semblable à HSP70 avec cependant un domaine de liaison au substrat ou SBD (pour Substrate Binding Protein) plus grand, ainsi qu'une extension de l'extrémité C-Ter (**Figure 14**)²¹⁶.

Il en existe deux isoformes principales, HSP110 α exprimée de façon constitutive dans la cellule, et HSP110 β dont l'expression est induite dans des conditions de stress. HSP110 β résulte d'un épissage alternatif de l'exon 12 aboutissant à une perte de 43 acides aminés à l'extrémité C-terminale.

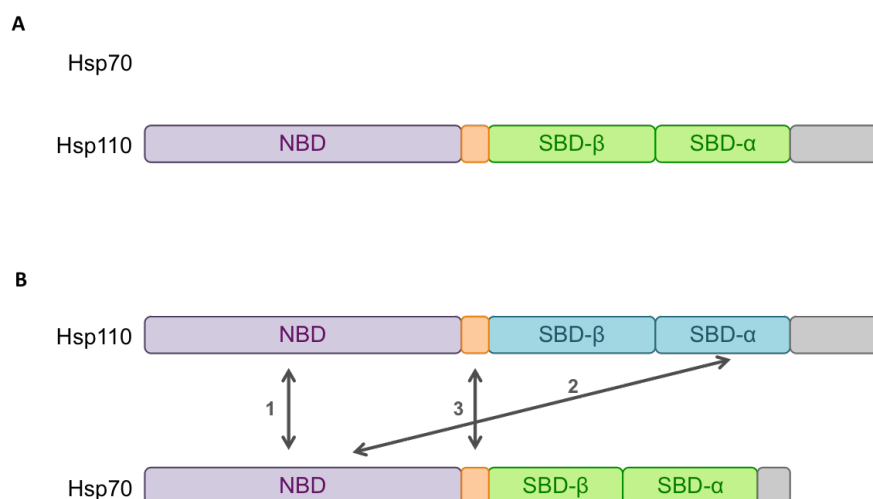


Figure 14 : Structure d'HSP110 et HSP70 et leur interaction

A) Représentation schématique des protéines HSP70 et HSP110. NBD: Nucleotide Binding Protein, domaine de liaison à l'ATP ou l'ADP, qui possède une activité ATPasique; SBD: Substrate Binding Protein, domaine divisé en deux sous-domaines (α et β). Le linker, un segment court et hautement conservé, fait le lien entre les domaines NBD et SBD. D'après *Xinping Xu et al. , The journal of biological chemistry, 2012.*

B) L'interaction des deux protéines implique: 1) l'interaction des domaines NBD des deux protéines, 2) l'interaction des domaine NBD d'HSP70 et SBD- α d'HSP110 qui contribue à la stabilité du complexe 3) et une interaction entre les deux linkers. D'après *Schuermann et al. , Molecular Cell, 2008.*

2. Rôle de la protéine HSP110

Plusieurs études suggèrent que HSP110 participe à de nombreux processus biologiques en association avec HSP70 cytosolique, notamment dans le repliement des protéines *de novo* ou secondairement à un stress, dans le transport des protéines dans le réticulum endoplasmique pour leur dégradation^{217, 218, 219, 220}.

HSP110 agit également comme un facteur d'échange nucléotidique ou NEF (pour Nucleotide Exchange Factor) pour HSP70, favorisant ainsi l'activité chaperonne de cette dernière^{221, 222}. Le mécanisme correspondant à cette activité de NEF a été révélé par un certain nombre d'études biochimiques et cristallographiques^{223, 224, 225} (**Figure 14**).

En outre, HSP110 possède également sa propre activité chaperonne. Contrairement à HSP70, HSP110 ne semble pas capable d'assister les protéines dans leur repliement, mais elle présente une forte activité dans la prévention de l'agrégation des protéines dénaturées, pour laquelle elle serait beaucoup plus efficace que HSP70^{226, 227}. Plus récemment, il a été décrit que cette activité chaperonne NEF-indépendante contribuerait : (1) directement à la formation et la propagation de prion²²⁸, (2) à la dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique²²⁹, et (3) à la présentation des antigènes tumoraux à la membrane^{230, 231}.

HSP110 semble également être un régulateur de l'inflammation intestinale. Il a été démontré que dans les cellules épithéliales intestinales, CD1d, impliqué dans la présentation d'antigènes lipidiques, protégeait de l'inflammation intestinale dépendamment de STAT3, IL10 et HSP110 (**Figure 15**)^{232, 233}. Dans une autre étude, HSP110 a été identifiée comme nouvelle cible thérapeutique dans les lymphomes non-Hodgkinien (NHL)²³⁴. Il existe une corrélation entre le niveau d'expression d'HSP110, la prolifération et l'agressivité des NHL. En ciblant directement HSP110 avec un anticorps spécifique, dans des modèles de xénogreffes en souris SCID, on observe une activité anti-tumorale significative *in vivo* contre des lignées cellulaires de lymphomes humains. L'effet anti-tumoral observé avec cet anticorps dirigé contre HSP110 semble être principalement dû à sa capacité d'activer l'ADCC (pour Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity) au site tumoral (recrutement de cellules CD-56+ et de granzyme B).

La protéine HSP110 est donc une protéine possédant sa propre activité chaperonne, ainsi qu'une activité co-chaperonne pour HSP70. L'activité chaperonne d'HSP110 est indépendante de l'ATP mais requière son domaine de liaison au substrat. En revanche, le domaine de liaison à l'ATP ainsi que le SDB sont nécessaires à son activité co-chaperonne d'HSP70.

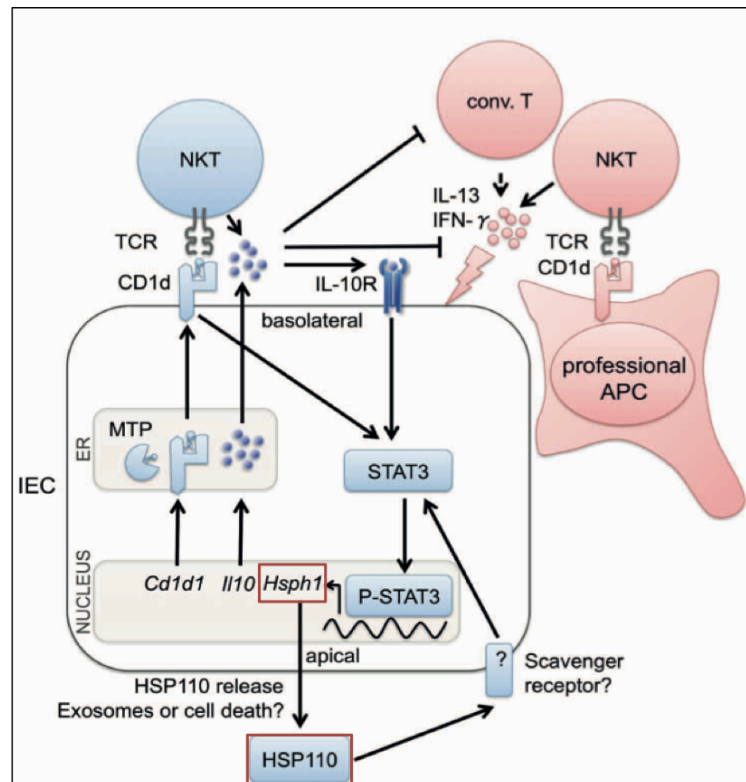


Figure 15 : Proposition de modèle pour la voie CD1d dans l'épithélium intestinal.

Effets protecteurs (bleu) ou pathogéniques (rouge) de la présentation d'antigène lipidique dans l'inflammation intestinale. HSP110 aurait un effet protecteur en activant la voie STAT3. Une inhibition d'un des facteurs impliqués dans cette voie (MTP, CD1d, IL-10 et HSP110) est associée à une inflammation intestinale incontrôlée. D'après Olszak et al., *Nature*, 2014.

3. HSP110 et cancers

A ce jour, peu de choses sont connues sur le rôle d'HSP110 dans la tumorigenèse. Au même titre que les autres protéines HSP, le niveau basal d'expression d'HSP110 est modifié dans les cellules cancéreuses. Une étude de 2009 a rapporté que l'expression d'HSP110 serait augmentée de plus de deux fois (analyse Microarray et RT-PCR quantitative) dans les cancers colorectaux avec envahissement métastatique des ganglions lymphatiques comparativement aux CCR non métastatiques^{235, 208}. Ces résultats sont en accord avec deux autres études qui montrent une augmentation d'HSP110 dans les adénocarcinomes colorectaux de stade avancé mais pas dans les adénomes^{236, 237}.

Actuellement, le rôle d'HSP110 dans les cancers n'a pas encore été clairement élucidé. Cependant, HSP110 pourrait être impliquée dans la tumorigenèse *via* ces propriétés anti-apoptotiques. Une surexpression d'HSP110 protégerait les cellules de l'apoptose dans différents modèles cellulaires^{238, 239}. Inversement, l'utilisation de si-RNA dirigé contre HSP110 dans une lignée de CCR MSI (HCT116) induit une augmentation de l'apoptose²⁴⁰. Dans un modèle cellulaire où l'apoptose est induite (traitement avec la Staurosporine), une augmentation d'HSP110 inhiberait l'apoptose en empêchant la translocation de BAX à la mitochondrie, aboutissant à un non-relargage de cytochrome C dans la cellule²⁴¹.

En ce qui concerne l'impact de cette protéine sur la survie, une surexpression des ARNm d'HSP110 dans les cancers colorectaux serait associée à une mauvaise survie de façon générale²³⁵. De façon contradictoire, il a été rapporté que dans les cancers de l'œsophage, le mauvais pronostic de ces cancers était associé à une diminution de l'expression d'HSP110²⁴².

RÉSULTATS

VUE SYNOPTIQUE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Les différents travaux de recherche présentés dans cette partie rapportent la mutation du gène codant la chaperonne HSP110 dans les cancers colorectaux (CCR) MSI et décryptent les conséquences moléculaires, fonctionnelles, physiopathologiques et cliniques de cette altération somatique dans ces tumeurs. Quatre articles originaux qui ont été déjà publiés ou sont soumis pour publication sur cette thématique et auxquels j'ai participé sont présentés. A la suite, j'ai fait figurer deux éditoriaux qui résument et commentent les résultats présentés dans ces articles originaux. A titre informatif, j'ai également inclus dans cette partie une brève rédigée relativement à la publication de nos travaux en 2011.

ARTICLE 1

Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Lagrange A, et al., *Nat. Med.* 2011 17(10) : 1283-9.

Le laboratoire a identifié la mutation de la protéine HSP110 dans les cancers colorectaux instables sur les microsatellites de l'ADN. Il s'agit de la première mutation affectant une chaperonne dans une pathologie tumorale à notre connaissance. Dans les cellules tumorales, cette mutation se caractérise par la délétion somatique d'un microsatellite mononucléotidique T₁₇ du gène *HSP110* au niveau du site accepteur d'épissage de l'intron 8. Le raccourcissement aberrant de cette séquence, dont la taille varie entre 1 et 7 pb dans l'ADN tumoral, a pour conséquence de favoriser un saut aberrant de l'exon 9 sur le transcrit du gène. Le transcrit aberrant contient un codon STOP prématuré dans l'exon 10 (décalage du cadre de lecture) et code en conséquence une forme mutante tronquée de la protéine HSP110, que nous avons nommée HSP110DE9. Cette protéine tronquée ne possède plus que le domaine de liaison à l'ATP (domaine N-Ter) et a perdu le domaine de liaison au substrat (domaine C-Ter).

D'un point de vue fonctionnel, nous avons investigué dans cette première publication la fonction de la protéine HSP110 sauvage (qui était encore très mal connue dans le modèle étudié, *i.e.* la cellule tumorale colique) et celle du mutant HSP110DE9 identifié. Notre étude montre : (i) que la protéine mutante HSP110DE9 interagit avec la protéine HSP110

sauvage et antagonise son activité lorsqu'on force son expression dans les cellules tumorales en culture (effet dominant négatif); (ii) qu'HSP110DE9 perd la capacité d'interaction avec d'autres protéines chaperonnes, telles qu'HSP70 ou encore HSP27, que possède la protéine HSP110 sauvage (facteur d'échange nucléotidique); (iii) qu'HSP110DE9 n'a plus de fonction anti-apoptotique, ce qui est le cas en revanche de la forme sauvage, et qu'HSP110DE9 inhibe même en présence de la protéine sauvage cette fonction de résistance à l'apoptose, notamment lorsqu'elle est induite par un stress cellulaire en culture; (iv) que la surexpression d'HSP110D9 sensibilise les cellules cancéreuses aux agents anticancéreux tels que le 5-FU et l'oxaplatine, utilisés en routine dans le traitement des CCR (stress apoptotique induit par le traitement).

Nous avons également analysé dans ce premier travail l'expression du transcrit *HSP110DE9* au niveau de modèles cellulaires et de tumeurs primitives MSS et MSI coliques (RT-PCR quantitative). La mise au point d'une méthode compétitive (quantification concomitante des transcrits *HSP110* sauvage et mutant; cf. article pour plus de détails) nous a permis de mesurer un ratio d'expression *HSP110DE9/HSP110wt* dans chaque échantillon. Ce ratio varie dans les échantillons analysés, et s'élève anormalement de manière très significative dans les lignées cancéreuses et tumeurs primitives de phénotype MSI, mutés sur le microsatellite T₁₇ (en comparaison des échantillons tumoraux MSS, sans mutation sur le microsatellite T₁₇).

Enfin, cette étude a permis de jeter les bases d'une première évaluation clinique de l'impact de notre découverte, en faisant l'hypothèse que la mutation de la chaperonne HSP110 pouvait modifier la réponse au traitement des malades avec un CCR MSI (CCR de stade II, n=59, stade III, n=25). Avec cet objectif, nous avons ainsi analysé s'il pouvait exister une corrélation significative entre le ratio d'expression *HSP110DE9/HSP110wt* (par RT-PCR quantitative) et la survie des malades dans cette cohorte de petite taille. Il est ressorti de cette étude préliminaire que ce ratio d'expression pouvait en effet prédire une réponse à la chimiothérapie des patients, une forte expression de ce ratio étant associée à un meilleur pronostic chez les malades traités avec une chimiothérapie adjuvante à la chirurgie.

ARTICLE 2

Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T₁₇ have improved response to 5-Fluorouracil-based chemotherapy. Collura A, Lagrange A, et al., *Gastroenterology* 2014 146(2):401-11.

Dans la continuité de la précédente étude qui se fondait essentiellement sur l'analyse de modèles cellulaires, nous avons voulu caractériser plus avant la mutation d'*HSP110* dans les CCR primitifs, les répercussions exactes de cette mutation sur l'expression de la chaperonne dans ces tumeurs et l'impact que cette altération pouvait avoir en clinique sur une plus grande cohorte de malades.

Nous avons pu confirmer que dans les CCR primitifs, il existait bien une corrélation positive entre la taille de la délétion du microsatellite T₁₇ dans l'ADN tumoral et le ratio d'expression *HSP110DE9/HSP110* tel que mesuré par RTPCR quantitative (méthode compétitive ; cf. supra). En outre, nos résultats ont permis de disséquer la mécanistique exacte d'expression des formes sauvages et mutantes dans des sous-clones de lignées de CCR MSI dont le statut de délétion du T₁₇ était très précisément connu et variait ; en résumé, la délétion du T₁₇ entraînait une perte d'expression complète de la protéine sauvage lorsqu'elle dépassait 4 pb au niveau d'un allèle du gène dans un ADN tumoral. Le mutant *HSP110DE9* montrait en revanche une expression assez constante dans les modèles cellulaires investigués, sans être influencé significativement par le statut de délétion du T₁₇ (cf. article 3 pour plus de précision sur ces aspects relatifs à la régulation de l'expression du mutant *HSP110DE9* dans les cellules tumorales).

En complément, nous avons démontré que les mutations du microsatellite T₁₇ étaient très majoritairement bi-alléliques dans les CCR MSI primitifs. Pour ce faire, nous avons dû analyser une série d'une trentaine de tumeurs par microdissection, afin de s'affranchir de la contamination constante des échantillons par de l'ADN non tumoral (stroma des tumeurs) venant brouiller le signal en PCR.

Enfin, cette étude a pour la première fois permis de poser la question de l'impact réel de la mutation d'*HSP110* sur un plan clinique dans de bonnes conditions. Une grande série

multicentrique de patients avec un CCR MSI a pu être étudiée dans une analyse de survie. La délétion du microsatellite T₁₇ a ainsi pu être retrouvée dans une grande majorité des tumeurs MSI analysées (n= 319/329, soit 97% des malades). Chaque échantillon tumoral a pu être classé de fait en fonction du statut de délétion du gène *HSP110* sur le microsatellite T₁₇ intronique (raccourcissement de 1 à 7 pb). Brièvement, une étude de survie dans cette cohorte (divisée en 2 groupes de patients ; groupe d'initiation et groupe de validation) a permis d'identifier une taille critique de la délétion (≥ 5 pb) dans les ADNs tumoraux au delà de laquelle la réponse des malades à une chimiothérapie adjuvante était significativement améliorée. Les tumeurs MSI ont ainsi été classées en deux catégories : (1) les tumeurs montrant de petites délétions, dites 'small' (statut Del^S), allant de 0 à 4pb ; (2) les tumeurs montrant de grandes délétions, dites 'large' (statut Del^L), supérieures ou égales à 5pb. Les patients avec un CCR MSI de stade II ou III, ayant bénéficié d'une chimiothérapie adjuvante et dont la tumeur montrait une 'large' délétion du microsatellite (23,4% des patients inclus dans l'étude) avaient une survie significativement améliorée par rapport aux autres patients (petites délétions du T₁₇ dans la tumeur). L'interaction en survie entre le statut de traitement des malades par chimiothérapie (oui ou non) et le statut de délétion du T₁₇ dans les tumeurs ('large' ou 'small') était significative, indiquant un effet bénéfique de la mutation 'large' limité au contexte de traitement des malades par chimiothérapie adjuvante à la chirurgie (pas d'effet pronostique chez les patients traités par chirurgie seule). Il semblait en outre que le statut de délétion du T₁₇ restait un critère valable pour prédire la réponse à une chimiothérapie par 5-FU seul. Ces dernières données sont d'intérêt lorsqu'on sait que les CCR MSI sont généralement décrits comme des tumeurs dont la résistance au 5-FU est importante (cf. introduction sur ce point).

ARTICLE 3

Mutation of HSP110 inhibits tumour growth through a STAT3/NMD Druggable Pathway in Colorectal Cancer. *Lagrange A, et al., en soumission.*

L'objectif de ce troisième article, soumis pour publication, a été d'investiguer le rôle physiopathologique éventuel de la mutation de la chaperonne HSP110 dans la processus

tumorigénique colique, au delà de son impact déjà proposé vis à vis de la réponse au traitement des patients.

Dans ce travail, nous avons pu démontrer que la mutation d'HSP110 avait un impact très clairement délétère pour les cellules tumorales, conduisant à une inhibition drastique de leur prolifération en culture et de la croissance des tumeurs en conséquence (modèle de xénogreffes en souris nude). Nous démontrons que cet impact est en partie lié à l'inhibition de l'activité d'une voie HSP110/STAT3 dans la cellule cancéreuse, en parfaite cohérence avec le rôle récemment rapporté d'HSP110 pour favoriser la phosphorylation et donc l'activation du facteur de transcription STAT3^{233, 243}.

En outre, nous montrons dans ce travail qu'un tel effet découle directement de la répercussion de la mutation d'*HSP110* qui entraîne une diminution (cellules tumorales avec délétion 'small') voire une extinction complète de l'expression de la chaperonne (cellules tumorales avec délétion 'large'). En revanche, nous démontrons une prise en charge efficace du transcrit mutant *HSP110DE9* par le NMD qui réprime l'expression de ce transcrit contenant un codon STOP prématuré dans le 10^{ème} exon du gène et empêche toute activité significative de ce mutant au cours de la progression tumorale en conséquence.

Dans la continuité de ces données, une approche d'inhibition du NMD est donc développée dans ce manuscrit à visée thérapeutique. Nous montrons que la perte d'activité d'un tel système de maintenance de la transcription permet en effet de débrider l'expression du mutant dominant négatif *HSP110DE9* dans les cellules tumorales MSI et d'observer en conséquence les effets délétères consécutifs à une perte de l'activité d'HSP110 sauvage (inhibition de la prolifération en rapport avec l'inhibition de la voie STAT3 en particulier). De manière remarquable, de tels effets sont observés non seulement sur des cellules en culture mais également en souris nude (souris greffées avec des modèles de CCR MSI et traitées avec un inhibiteur du NMD, l'amlexanox). Il convient de noter que l'Amlexanox est une molécule qui a déjà obtenue une AMM en clinique dans le traitement de l'asthme, des aphtes²⁴⁴ et qu'elle a été récemment décrite comme inhibiteur du NMD par un de nos collaborateurs, participant à cette étude (Fabrice Lejeune)²⁴⁵. Son impact sur la croissance tumorale des CCR est spécifique des modèles MSI (pas d'effet sur la croissance de xénogreffes tumorales MSS dans les mêmes conditions).

ARTICLE 4

HSP110 T₁₇, a next generation marker for the detection of microsatellite instability in colorectal cancer. *Buhard O, Lagrange A, et al., en soumission.*

Dans ce quatrième et dernier article, nous avons émis l'hypothèse d'un intérêt diagnostique d'*HSP110*, en tant que marqueur dont le statut mutationnel (délétion somatique du microsatellite intronique T₁₇) pourrait être en effet un bon indicateur du phénotype MSI d'une tumeur, en particulier dans les CCR.

Il convient de préciser que l'évaluation du statut MSI, à l'instar de la répétition T₁₇, est basée sur la détection de délétions somatiques au niveau de longues répétitions génomiques non-codantes dans l'ADN tumoral (cf. introduction pour plus de détails). Un premier panel de cinq marqueurs a été proposé (panel de Bethesda), comprenant 3 répétitions dinucléotidiques et 2 répétitions mononucléotidiques. Les tumeurs ayant une instabilité sur deux ou plus de ces marqueurs sont considérées comme MSI-*High*. Les tumeurs ne montrant une instabilité que sur un marqueur ou aucun des cinq marqueurs sont considérées comme MSI-*Low* ou MSS respectivement. Plus récemment, un nouveau panel de cinq marqueurs mononucléotidiques (pentaplex) a pu être proposé par le laboratoire d'accueil, dont l'intérêt majeur réside dans le fait qu'ils ne nécessitent pas une analyse simultanée de leur statut dans l'ADN germlinal et tumoral des malades pour établir un diagnostic de certitude. Ce panel a une sensibilité et une spécificité très élevée. Néanmoins, (i) la lecture des marqueurs qu'il comprend est parfois difficile, notamment dans le contexte d'échantillons tumoraux très contaminés par de l'ADN normal (situation fréquente en clinique ; notion de faux négatifs), (ii) la co-amplification de plusieurs marqueurs est nécessaire mais n'est pas toujours possible en routine (ADNs tumoraux de mauvaises qualités) ; (iii) la région polymorphe de ces marqueurs est assez importante et couvre plusieurs paires de bases, ce qui peut gêner la détection d'allèles instables de petites tailles dans la tumeur (manque de sensibilité) ; (iv) la méthode peut générer par ailleurs des résultats aberrants, car certains marqueurs montrent des allèles très rares qui peuvent mimer une instabilité microsatellitaire (notion de faux positifs par polymorphisme).

Afin d'évaluer l'intérêt potentiel du marqueur T₁₇ seul dans le diagnostic des tumeurs MSI, nous avons investigué une série de tumeurs MSS (n=366) et de tumeurs MSI (n=313) et comparé le statut du marqueur T₁₇ d'une part avec celui des marqueurs de la pentaplex, déjà analysés sur ces cohortes. En cas de réponse divergente concernant le statut MSI/MSS des tumeurs avec les 2 méthodes, la tumeur a été analysée pour son statut MMR (Immunohistochimie), afin de trancher. Nous avons également analysé le statut du marqueur T₁₇ dans une très large cohorte d'ADNs en provenance de différentes populations représentatives de la diversité génétique des populations humaines à l'échelle de la planète (panel HGDP du CEPH, Centre d'Etude du Polymorphisme Humain). Brièvement, nos résultats démontrent que : (i) le marqueur T₁₇ est remarquablement monomorphe puisque 2 allèles seulement (T₁₆ T₁₇) ont pu être identifiés dans les ADNs constitutionnels issus du panel HGDP ; (ii) le marqueur T₁₇ est plus sensible et plus spécifique pour identifier le phénotype MSI d'une tumeur que les panels de marqueurs proposés jusqu'à lors (cf. article soumis pour plus de détails). Il permet en particulier d'identifier plus facilement des délétions alléliques de petites tailles dans certaines tumeurs ; (iii) le marqueur T₁₇ est plus simple à lire que les autres marqueurs, en particulier à cause de son exceptionnel monomorphisme dans les ADNs normaux. En conséquence, nous avons pu proposer dans ce manuscrit que sa lecture soit automatisée, dans le but d'assister demain les cliniciens qui seront susceptibles de l'utiliser en routine sans être nécessairement des spécialistes du domaine.

EDITORIAL 1

Microsatellite Instability in colorectal cancer : Time to stop Hiding ! Duval A, Collura A, Berthenet K, Lagrange A, Garrido C. *Oncotarget* 2011 Nov;2(11):826-7.

Cet éditorial reprend de manière très condensée les résultats obtenus dans le premier article.

EDITORIAL 2

Mutation d'HSP110 dans les cancers colorectaux. Le paradoxe du chaperon qui ne protège plus. Garrido C, Collura A, Berthenet K, Lagrange A, Duval A. *Med Sci* 2012 28(1):9-10.

Ce deuxième éditorial reprend également une partie des résultats obtenus dans le premier article. A la différence du précédent éditorial, ce manuscrit discute autour de la question de l'existence d'une telle mutation dans les CCR et de sa sélection apparente dans ces tumeurs malgré son effet fonctionnel *a priori* délétère.

Au total, l'ensemble de ces travaux de recherche, développés dans quatre articles originaux et deux éditoriaux présentés ci-après, a permis de décrire la mutation de la protéine chaperonne HSP110 et l'impact moléculaire, fonctionnelle, physiopathologique et clinique de cette altération dans les cancers colorectaux MSI.

ARTICLE 1

Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis.

Nature Medicine (2011)

Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis

Coralie Dorard^{1,2}, Aurélie de Thonel^{3,4}, Ada Collura^{1,2}, Laetitia Marisa⁵, Magali Svrcek^{1,2,6}, Anaïs Lagrange^{1,2}, Gaetan Jégo^{3,4}, Kristell Wanherdrick^{1,2}, Anne Laure Joly^{3,4}, Olivier Buhard^{1,2}, Jessica Gobbo^{3,4}, Virginie Penard-Lacronique⁷, Habib Zouali⁸, Emmanuel Tubacher⁸, Sylvain Kirzin⁹, Janick Selves⁹, Gérard Milano¹⁰, Marie-Christine Etienne-Grimaldi¹⁰, Leila Bengrine-Lefèvre¹¹, Christophe Louvet¹¹, Christophe Tournigand¹¹, Jérémie H Lefèvre^{2,12}, Yann Parc^{2,12}, Emmanuel Tiret^{2,12}, Jean-François Fléjou^{1,2,6,13}, Marie-Pierre Gaub¹⁴, Carmen Garrido^{3,4,15,16} & Alex Duval^{1,2,16}

Heat shock proteins (HSPs) are necessary for cancer cell survival. We identified a mutant of HSP110 (HSP110 Δ E9) in colorectal cancer showing microsatellite instability (MSI CRC), generated from an aberrantly spliced mRNA and lacking the HSP110 substrate-binding domain. This mutant was expressed at variable levels in almost all MSI CRC cell lines and primary tumors tested. HSP110 Δ E9 impaired both the normal cellular localization of HSP110 and its interaction with other HSPs, thus abrogating the chaperone activity and antiapoptotic function of HSP110 in a dominant-negative manner. HSP110 Δ E9 overexpression caused the sensitization of cells to anticancer agents such as oxaliplatin and 5-fluorouracil, which are routinely prescribed in the adjuvant treatment of people with CRC. The survival and response to chemotherapy of subjects with MSI CRCs was associated with the tumor expression level of HSP110 Δ E9. HSP110 may thus constitute a major determinant for both prognosis and treatment response in CRC.

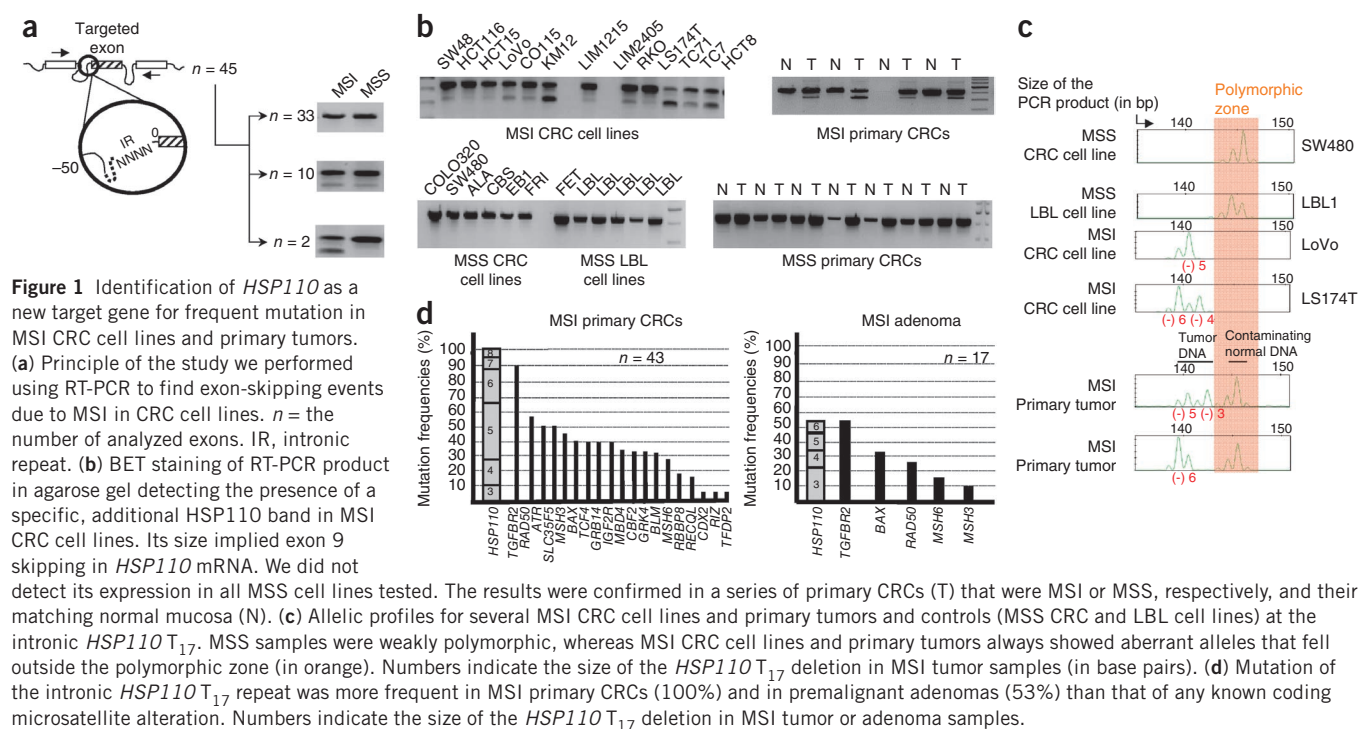
The human tumor phenotype referred to as MSI arises because of defects in the DNA mismatch repair (MMR) system^{1–3}. MSI was first observed in inherited tumors associated with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) and later in sporadic colon, gastric and endometrial cancers (for a review, see ref. 4). The normal function of the MMR system is to recognize and repair the errors that arise during DNA replication, as well as to repair some forms of DNA damage. It is now well established that MMR deficiency is not in itself a direct transforming event and that MSI tumors develop through a distinctive molecular pathway characterized by the genetic instability of numerous microsatellite repeat sequences throughout the genome⁴. Most oncogenic alterations found in MSI tumors are thus somatic mutational events that affect coding repeated sequences. The majority of published articles on the mechanisms underlying MSI carcinogenesis have involved the study of CRC. These revealed that MSI CRCs are a distinctive group from the major tumor type called chromosomal

instability (CIN) or microsatellite stable (MSS) (for review, see ref. 5). In addition to the genetic instability in coding repeats, MSI tumor cells accumulate hundreds of alterations in noncoding microsatellite repeats throughout the genome⁶, but the functional consequences of these mutations have yet to be thoroughly investigated.

Although MSI cancers are considered to represent a distinct tumor entity, there is still no specific therapeutic approach that takes into account the unique mode of cell transformation seen within these tumors. MSI CRCs have been consistently reported to show an improved prognosis and a different response to chemotherapeutic agents^{7,8}. The reasons underlying these clinical observations are still poorly understood. Here we identified HSP110 as a target gene for mutation in MSI CRCs. HSP110 is a conserved and abundant molecular chaperone whose expression is induced by a specific set of stress conditions. HSP110 accumulates abnormally in cancer cells, and this is believed to enhance

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe 'Instabilité des Microsatellites et Cancers', Paris, France. ²Université Pierre et Marie Curie Paris, Paris, France. ³INSERM, Dijon, France. ⁴University of Burgundy, Dijon, France. ⁵Programme 'Cartes d'Identité des Tumeurs', Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France. ⁶Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France. ⁷INSERM, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France. ⁸Centre d'Etude du Polymorphisme Humain, Fondation Jean Dausset, Institut de Génétique Moléculaire, Paris, France. ⁹INSERM, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France. ¹⁰Laboratoire d'Oncopharmacologie, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France. ¹¹Service d'Oncologie Médicale, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France. ¹²AP-HP, Service de Chirurgie Générale et Digestive, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France. ¹³AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Tumorothèque Cancer Est, Paris, France. ¹⁴INSERM, Développement et Physiopathologie de l'Intestin et du Pancréas, Strasbourg, France. ¹⁵Centre Hospitalier Universitaire Dijon, Dijon, France. ¹⁶These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to A.D. (alex.duval@inserm.fr) or C.G. (cgarrido@u-bourgogne.fr).

Received 23 February; accepted 1 August; published online 25 September 2011; doi:10.1038/nm.2457



their survival^{9–12}. It is strongly expressed in colon cancer cells¹³, and gene expression profile analysis of primary CRC has linked *HSP110* expression with metastasis and poor prognosis¹⁴.

We show in this work that a T₁₇ mononucleotide repeat located in intron 8 of *HSP110* was systematically mutated in MSI CRC cell lines and primary tumors. The shortening of this repeat in tumor DNA correlated with increased synthesis of an aberrant *HSP110* transcript due to exon 9 skipping, to the detriment of wild-type *HSP110* mRNA. The mutant transcript encoded a truncated isoform of *HSP110*, referred to as *HSP110*ΔE9. The overexpression of *HSP110*ΔE9 in CRC cells severely affected the function of *HSP110* chaperone in a dose-dependent manner. *HSP110*ΔE9 expression also increased the sensitivity to anti-cancer agents such as oxaliplatin and 5-fluorouracil (5-FU), which are routinely prescribed in the adjuvant treatment of CRC patients. In agreement with these *in vitro* findings, the survival of people with MSI CRC was associated with the tumor expression level of *HSP110*ΔE9.

RESULTS

HSP110 T₁₇ intronic DNA microsatellite mutations in MSI CRC

To find new mutations with a putative role in MSI-driven carcinogenesis, we analyzed the expression pattern of 45 candidate exons located downstream of an intron containing a mononucleotide repeat sequence of at least eight nucleotides in the vicinity of the splice acceptor site (Supplementary Table 1 and Fig. 1a). The search was undertaken by nonquantitative RT-PCR using a set of human MSI and MSS CRC cell lines ($n = 20$; 13 MSI, 7 MSS). A total of 43 exons were found to have the same expression pattern in MSI and MSS cancer cell lines (Fig. 1a). In the remaining two cases (*MRE11* (current symbol *MRE11A*) and *HSP110*), the presence of an additional PCR product was only detectable in MSI CRC cell lines. This was due to exon 5 skipping in *MRE11* (data not shown), as reported elsewhere⁶, and exon 9 skipping in *HSP110* (Fig. 1b and data not shown). We found the presence of this additional *HSP110* RT-PCR product to be specific to MSI primary colorectal tumor samples

(Fig. 1b). We did not detect it in a series of nontumor human cell lines used as additional MMR-proficient controls (lymphoblastoid cell lines, LBLs; $n = 20$) (Fig. 1b). Among subjects with primary MSI CRC, amplification of the additional RT-PCR product was restricted to MSI tumor tissues and was never observed in matching normal mucosal samples (Fig. 1b).

Next, we determined the mutational status of the *HSP110* T₁₇ DNA repeat located upstream and near the splice acceptor site in intron 8 (Supplementary Fig. 1). Allelic profiles of this noncoding repeat were analyzed using fluorescence genotyping in our panel of MSI and MSS CRC cell lines and primary tumors, as well as in control LBLs to assess its polymorphic status (Supplementary Table 2). Overall, we found that this sequence was weakly polymorphic in MMR-proficient samples (Fig. 1c), whereas it was systematically mutated in 13 of 13 (100%) MSI CRC cell lines and in 43 of 43 (100%) MSI CRC primary tumors. The allelic deletions ranged from three to eight base pairs beyond the polymorphic zone (Fig. 1c and Supplementary Table 2). The mutation frequency of *HSP110* T₁₇ was higher than that of all coding microsatellite targets reported to date in MSI primary CRC (Fig. 1d). We also detected this mutation in 9 of 17 (53%) adenomas with MSI, although with smaller allelic deletions than observed for MSI primary CRCs (Fig. 1d).

Overexpression of *HSP110* mRNA lacking exon 9 in MSI CRC

We first confirmed by quantitative RT-PCR that the two *HSP110* PCR products observed in MSI cancer cell lines corresponded to *HSP110* alternative mRNAs that contained or lacked exon 9 (Fig. 2a). We quantified both *HSP110* mRNA containing (*HSP110*wt) or lacking exon 9 (*HSP110*ΔE9) in a competitive manner (Supplementary Table 2). We observed that *HSP110*ΔE9 mRNA was weakly expressed in MSS CRC cell lines (below 5–10% of *HSP110*wt mRNA; Fig. 2b). In contrast, *HSP110*ΔE9 mRNA expression was higher in MSI CRC cell lines and was significantly different between MSI ($n = 43$) and MSS ($n = 20$) primary CRCs ($P = 8.5 \times 10^{-5}$; Fig. 2b and Supplementary Table 2).

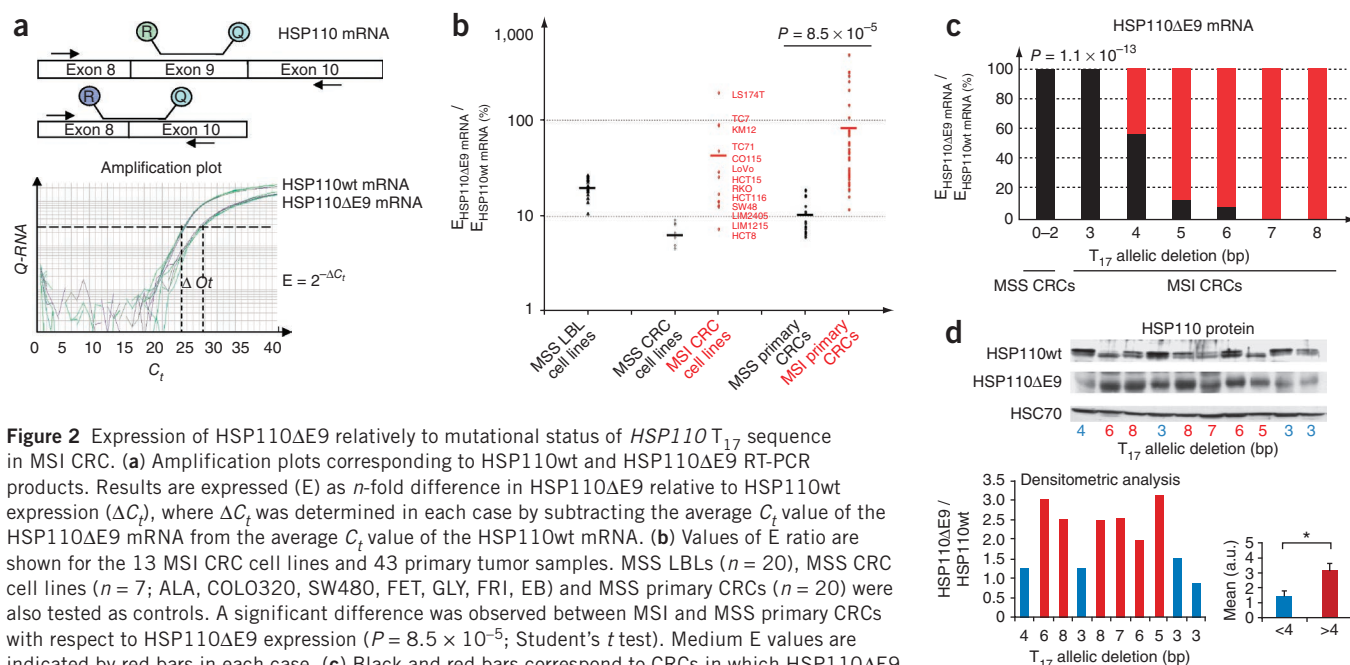


Figure 2 Expression of HSP110ΔE9 relative to mutational status of *HSP110* T_{17} sequence in MSI CRC. **(a)** Amplification plots corresponding to HSP110wt and HSP110ΔE9 RT-PCR products. Results are expressed (E) as n -fold difference in HSP110ΔE9 relative to HSP110wt expression (ΔC_t), where ΔC_t was determined in each case by subtracting the average C_t value of the HSP110ΔE9 mRNA from the average C_t value of the HSP110wt mRNA. **(b)** Values of E ratio are shown for the 13 MSI CRC cell lines and 43 primary tumor samples. MSS LBLs ($n = 20$), MSS CRC cell lines ($n = 7$; ALA, COLO320, SW480, FET, GLY, FRI, EB) and MSS primary CRCs ($n = 20$) were also tested as controls. A significant difference was observed between MSI and MSS primary CRCs with respect to HSP110ΔE9 expression ($P = 8.5 \times 10^{-5}$; Student's t test). Medium E values are indicated by red bars in each case. **(c)** Black and red bars correspond to CRCs in which HSP110ΔE9 mRNA expression was low or high, respectively (below or above the median value calculated in our tumor series; see also **Supplementary Table 2**). The size of the T_{17} deletion was significantly different between these two groups of tumors ($P = 1.1 \times 10^{-13}$; Student's t test). **(d)** Two different HSP110 antibodies (Abs) were used in western blots—one recognizing the C-terminal part of the protein and detecting the α and β HSP110 isoforms (upper blot) and the other targeting the N-terminal part and detecting HSP110ΔE9 (this Ab detects HSP110βE9 only weakly). Error bars correspond to the s.d. of measured densitometric values. $*P < 0.05$. a.u., arbitrary units.

We next investigated whether mutation of the *HSP110* T_{17} intronic DNA repeat might influence the expression of HSP110 in our series of primary CRCs. We found that the length of T_{17} deletion was associated with significantly increased expression of HSP110ΔE9 mRNA, to the detriment of the HSP110wt transcript (**Fig. 2c**; $P = 1.1 \times 10^{-13}$). HSP110ΔE9 mRNA was generally expressed at low levels in MSI tumors showing small T_{17} deletions (3 or 4 bp; **Fig. 2c**), or in MSS tumors that were not mutated. In contrast, it was highly expressed in MSI tumors with larger T_{17} deletions (from 5 to 8 bp; **Fig. 2c**). We confirmed these results at the protein level using western blotting in 10 MSI primary CRCs that showed variable allelic shifts in the T_{17} repeat (**Fig. 2d**; $P < 0.05$). We concluded that mutation of the *HSP110* intronic T_{17} microsatellite was probably the causative event leading to aberrant expression of this chaperone in colorectal tumors.

Altered HSP110ΔE9 chaperone sensitizes cancer cells to die

The skipping of HSP110 exon 9 causes a frameshift that leads to the generation of a premature termination codon in exon 10 of HSP110ΔE9 mRNA (**Supplementary Fig. 1**). HSP110ΔE9 is a truncated protein that contains the N-terminal ATP-binding domain but is devoid of the substrate-binding domain (**Supplementary Fig. 1**). We used several functional assays to understand the role of HSP110ΔE9. We first studied its chaperone activity using a protein thermolability assay that measures the *in vitro* ability of HSP110 to block protein aggregation induced by a heat shock. Although HSP110wt showed antiaggregation activity comparable to other HSPs such as HSP70, HSP110ΔE9 did not demonstrate this chaperone activity (**Fig. 3a**). Interestingly, this effect was dominant negative, because the antiaggregation activity of HSP110wt was abrogated if HSP110ΔE9 was added (**Fig. 3a**). HSP110 has been shown to associate with other chaperones such as HSP70, and this contributes to the overall cell chaperone network. We confirmed here in HCT116 cells that HSP110wt efficiently

interacted with HSP70 and with HSP27, but not with HSP90 (**Fig. 3b**). In contrast, HSP110ΔE9 lost the ability to associate with HSP70 and HSP27 (**Fig. 3b**) but associated strongly with HSP110wt, in line with its dominant-negative effect (**Fig. 3c**). Finally, HSP110ΔE9 showed an altered cellular localization compared to HSP110wt. Although we found the latter both in the nucleus and cytosol, HSP110ΔE9 was restricted to the cytosol (**Fig. 3d**). Further, HSP110ΔE9 was able to block HSP110 translocation into the nucleus (**Fig. 3e**).

In a xenograft mouse model, HSP110ΔE9 expression significantly decreased the tumorigenicity of HCT116 cells (**Fig. 4a**). Because the role of HSPs including HSP110 in cancer has been linked to their antiapoptotic properties, we investigated the effect on apoptosis of the HSP110 truncation. HCT116, LoVo (MSI) and SW480 (MSS) cells were transfected with HSP110wt or HSP110ΔE9, and apoptosis was triggered using TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand). As expected, TRAIL induced dose-dependent apoptosis and HSP110wt exerted a protective effect, as demonstrated by the appearance of well-known apoptotic markers including caspase 8 cleavage, caspase 3 activity, cleavage of the caspase 3 target PARP, mitochondrial membrane permeation and nuclear condensation (**Fig. 4b–d** and **Supplementary Fig. 2**). In contrast, HSP110ΔE9 not only lacked the protective properties of HSP110wt but was also able to block its antiapoptotic function in a dose-dependent manner (**Fig. 4c–e**). Probably as a consequence, the overexpression of HSP110ΔE9 in various CRC cell lines (both MSI and MSS) increased their sensitivity to anticancer agents such as oxaliplatin and 5-FU, two drugs commonly used in the adjuvant treatment of CRC patients (**Fig. 4f**, **Supplementary Fig. 3** and data not shown).

HSP110ΔE9 affects survival and response to chemotherapy

We next investigated the possible clinical relevance of HSP110ΔE9 by evaluating the expression of HSP110ΔE9 mRNA relative to HSP110wt

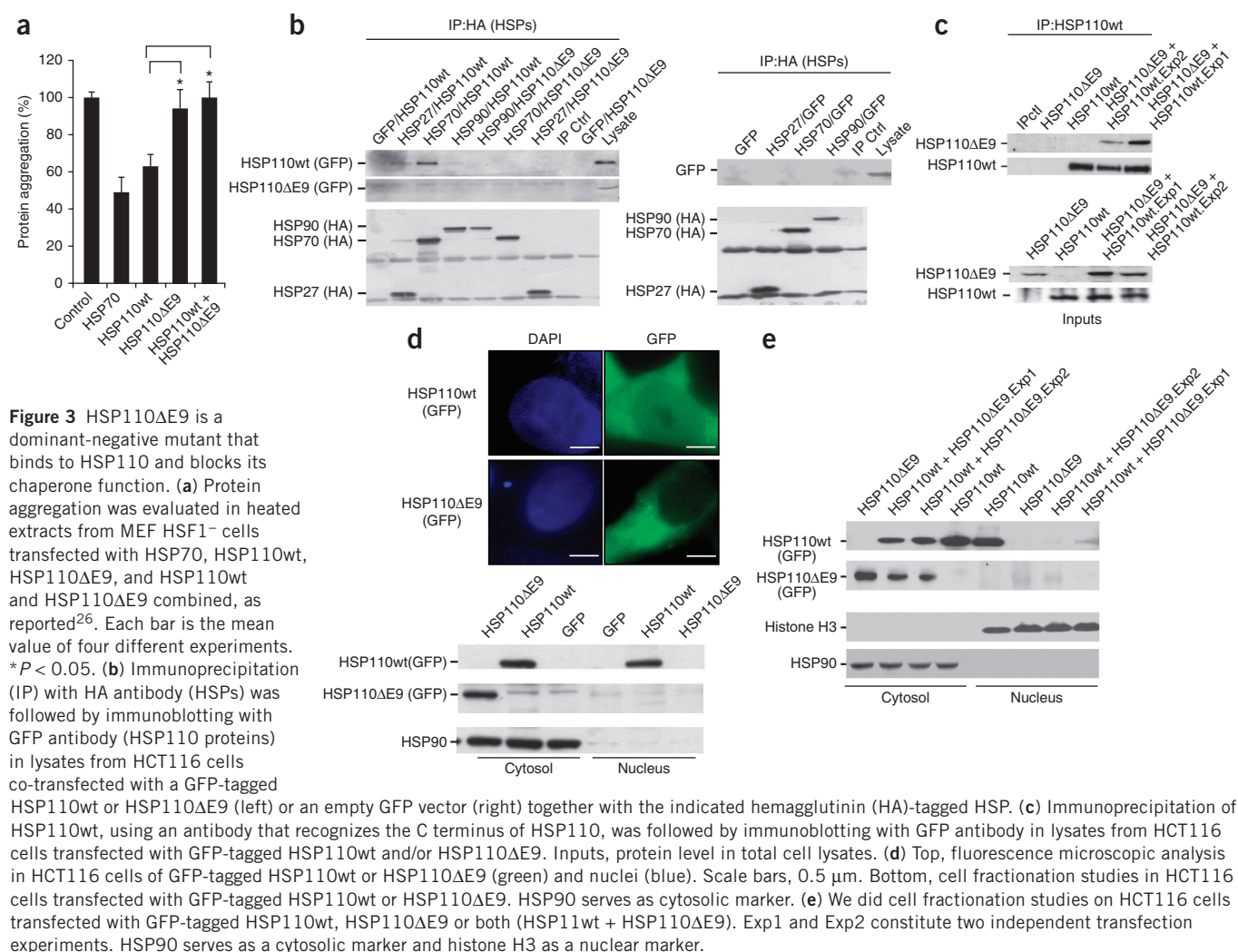


Figure 3 HSP110ΔE9 is a dominant-negative mutant that binds to HSP110 and blocks its chaperone function. **(a)** Protein aggregation was evaluated in heated extracts from MEF HSF1⁻ cells transfected with HSP70, HSP110wt, HSP110ΔE9, and HSP110wt and HSP110ΔE9 combined, as reported²⁶. Each bar is the mean value of four different experiments. **P* < 0.05. **(b)** Immunoprecipitation (IP) with HA antibody (HSPs) was followed by immunoblotting with GFP antibody (HSP110 proteins) in lysates from HCT116 cells co-transfected with a GFP-tagged HSP110wt or HSP110ΔE9 (left) or an empty GFP vector (right) together with the indicated hemagglutinin (HA)-tagged HSP. **(c)** Immunoprecipitation of HSP110wt, using an antibody that recognizes the C terminus of HSP110, was followed by immunoblotting with GFP antibody in lysates from HCT116 cells transfected with GFP-tagged HSP110wt and/or HSP110ΔE9. Inputs, protein level in total cell lysates. **(d)** Top, fluorescence microscopic analysis in HCT116 cells of GFP-tagged HSP110wt or HSP110ΔE9 (green) and nuclei (blue). Scale bars, 0.5 μm. Bottom, cell fractionation studies in HCT116 cells transfected with GFP-tagged HSP110wt or HSP110ΔE9. HSP90 serves as cytosolic marker. **(e)** We did cell fractionation studies on HCT116 cells transfected with GFP-tagged HSP110wt, HSP110ΔE9 or both (HSP11wt + HSP110ΔE9). Exp1 and Exp2 constitute two independent transfection experiments. HSP90 serves as a cytosolic marker and histone H3 as a nuclear marker.

transcript in stage 2 and stage 3 MSI primary CRCs. This was done in an initial retrospective series of subjects (*n* = 30; 20 stage 2 and 10 stage 3; **Supplementary Table 3**) who underwent curative surgical resection of histologically proven MMR-deficient CRC for whom clinical data and appropriate tissue material was available. Stage 2 and stage 3 tumors were stratified into two groups according to their level of HSP110ΔE9 expression (i.e., MSI-HSP110ΔE9^{high} and MSI-HSP110ΔE9^{low} tumors). Our *in vitro* results described above showed a clear sensitization of cancer cells to anticancer agents such as oxaliplatin and 5-FU when the HSP110ΔE9/HSP110wt protein ratio increased (**Supplementary Fig. 4**). Using a HSP110ΔE9/HSP110wt mRNA ratio of 75%, MSI-HSP110ΔE9^{high} subjects showed disease-free survival (DFS) and response to chemotherapy that differed from those of MSI-HSP110ΔE9^{low} subjects. The difference in DFS approached significance for persons with stage 3 MSI CRC and for people who received adjuvant chemotherapy but not for those with stage 2 MSI CRC (**Supplementary Fig. 5**).

To validate the above clinical findings, we did similar analysis on an independent series of subjects with MSI CRC (*n* = 54; 30 stage 2 and 24 stage 3; **Supplementary Table 3**). Here again, a closely related HSP110ΔE9/HSP110wt mRNA ratio (50%) revealed the clinical impact of the HSP110 mutant on survival and response to chemotherapy. This impact was substantial for persons with stage 3 CRC

and for people who received adjuvant chemotherapy (**Supplementary Fig. 5**). The two subject series were combined to obtain greater statistical power. However, significant results were also obtained for subjects with stage 3 MSI CRC when the cutoff point corresponding to 75% was used for both series, after necessary normalization of the HSP110ΔE9/HSP110wt ratio for the two series (*P* = 0.042, *N*_{HSP110ΔE9^{high}} = 7, *N*_{HSP110ΔE9^{low}} = 18; data not shown). In the overall series, the survival and response to chemotherapy of persons with stage 3 MSI CRC were confirmed in univariate analyses to be associated with the tumor expression level of HSP110ΔE9 (**Fig. 5** and **Table 1**). In multivariate analysis, HSP110ΔE9 was found to be an independent predictor of outcome in persons with MSI CRC (**Table 1** and **Supplementary Table 4**).

DISCUSSION

Like other stress-inducible HSPs, HSP110 protects the cell against adverse conditions. HSP110 also provides specific crucial functions, as *hsp110* gene knockout in both yeast and *Drosophila* is lethal¹⁵. Two different isoforms of HSP110 have been described, HSP110a and HSP110b, but their different functions in the cell, if any, are unknown. HSP110b results from alternative splicing of exon 12 and lacks 43 amino acids from the C-terminal part of HSP110a. Notably, HSP110a and HSP110b isoforms are irrelevant to generation of the truncated

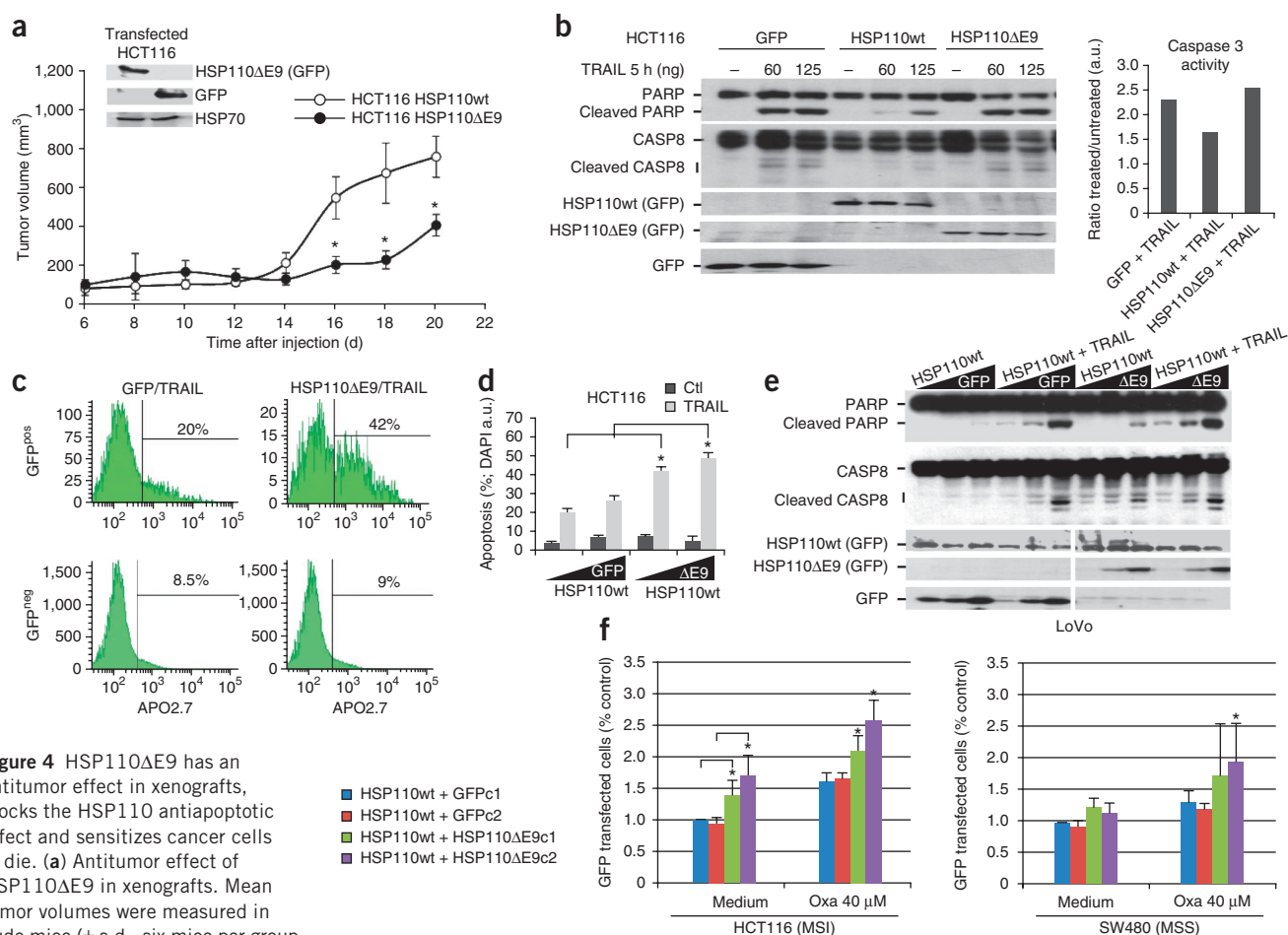


Figure 4 HSP110ΔE9 has an antitumor effect in xenografts, blocks the HSP110 antiapoptotic effect and sensitizes cancer cells to die. (a) Antitumor effect of HSP110ΔE9 in xenografts. Mean tumor volumes were measured in nude mice (± s.d., six mice per group). **P* < 0.05. (b) Apoptosis was measured by immunodetection of caspase 8 (CASP8) and PARP cleavage (left), or by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of caspase 3 activity (right), in HCT116 cells transfected with GFP-tagged HSP110wt, HSP110ΔE9 or an empty vector (GFP) and treated with recombinant TRAIL ligand. (c) FACS analysis of apoptosis in GFP-positive (GFP^{pos}, transfected with a GFP-empty vector or HSP110ΔE9) and GFP-negative (GFP^{neg}, non transfected) HCT116 cells treated with TRAIL. (d) The percentage of apoptosis (chromatin condensation) induced by TRAIL was determined in HCT116 cells transfected with GFP-tagged HSP110wt and increased doses of HSP110ΔE9 or an empty vector (GFP). (e) Immunoblot of caspase 8 (CASP8) and PARP cleavage in LoVo cells transfected as described in c and treated, when indicated, with TRAIL ligand. (f) HCT116 (MSI) or SW480 (MSS) cells transfected with HSP110wt (1.5 μg) were co-transfected with two different doses (c1, 0.5 μg and c2, 1 μg) of either GFP-empty vector or HSP110ΔE9. After treatment with oxaliplatin (Oxa, 40 μM, 48 h), apoptosis was assessed by FACS analysis as in b. **P* < 0.05. a.u., arbitrary units.

HSP110ΔE9 form identified here due to exon 9 skipping. HSP110 not only acts as a nucleotide exchange factor for HSP70 (ref. 16) but also possesses chaperone antiaggregation activity. It is approximately fourfold more efficient at binding and stabilizing denatured protein substrates compared to HSC70 and HSP70 (ref. 17). Because of its strong chaperone function, HSP110 is a very good antigen carrier and is therefore used as an extracellular protein in vaccine formulation^{18,19}. HSP110 chaperone activity is independent of ATP but requires the substrate-binding domain of the protein. HSP110ΔE9 lacks the substrate-binding domain. As a consequence, it has lost its HSP110 antiaggregation chaperone function and is unable to bind HSP70, thereby also losing its function as a nucleotide exchange factor for HSP70 proteins.

A possible explanation for HSP110 overexpression in CRC cells¹³ is that they must extensively rewire their metabolic and signal transduction pathways, thereby becoming dependent on proteins that are dispensable for the survival of normal cells. The tumorigenic properties of HSP110, although not fully understood, may in

part be explained by its antiapoptotic properties^{20,21}. Overexpression of HSP110 has been shown to protect against apoptotic cell death in different cellular models including colon cancer. Inversely, small interfering RNA-mediated depletion of HSP110 induces apoptosis in HCT116 cells¹⁰. Interestingly, we showed in this work that a similar induction of apoptosis in HCT116 cells was achieved by overexpression of the mutant HSP110ΔE9. We found that significant expression of HSP110ΔE9 was restricted to colon cancer cells with MSI, thus disadvantaging their survival. Indeed, HSP110ΔE9 has not only lost the normal HSP110 antiapoptotic properties but also associates with HSP110 to block these protective functions in a dose-dependent manner. Further, when overexpressed in both MSI and MSS CRC cells, HSP110ΔE9 sensitizes these cells to apoptosis induced by chemotherapeutic drugs. It is worth noting that these proapoptotic effects are optimized when HSP110ΔE9 expression is similar to or higher than that of HSP110wt. This probably occurs because each molecule of HSP110ΔE9 forms a complex with one molecule of HSP110wt, thus neutralizing its function.

ARTICLES

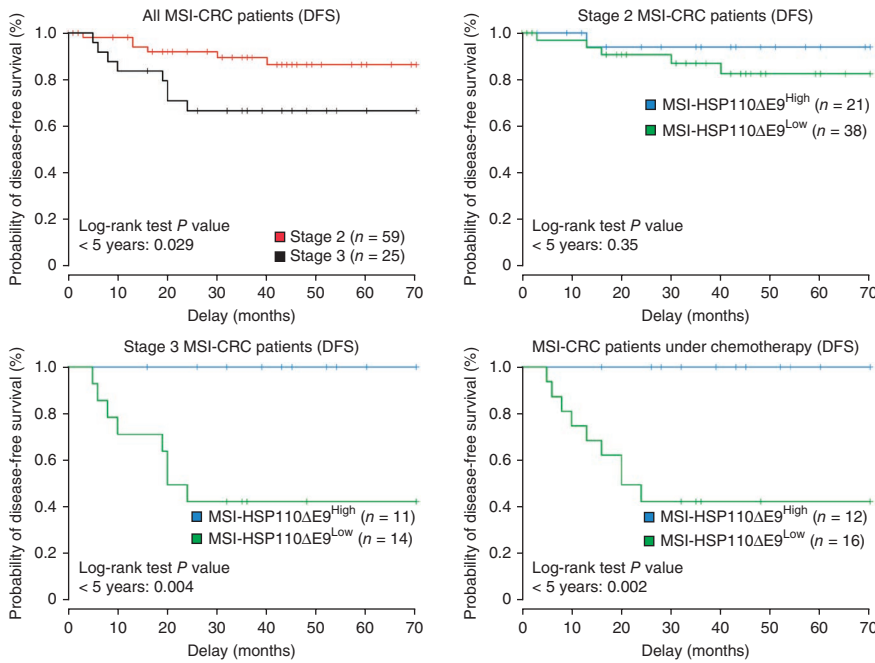


Figure 5 Clinical impact of HSP110ΔE9 expression in people with MSI CRC. Kaplan-Meier univariate analyses of disease-free survival (DFS) in persons with stage 2 or stage 3 MSI CRC are shown according to their HSP110ΔE9 expression. For statistical analyses, only the first 5 years are shown. Subjects from both series were combined using series-specific cutoff points to define HSP110ΔE9 expression classes (75% and 50% for first and second series, respectively).

It is unclear why there is selection of the HSP110ΔE9 dominant-negative and proapoptotic mutant in MSI CRCs. A possible explanation is that long, noncoding mononucleotide repeats such as the T₁₇ located in *HSP110* intron 8 are often hot spots for mutations in MSI tumors due to the MMR deficiency^{22,23}. Whereas most of these microsatellites are functionally anonymous, a few are endowed with biological activity. Even though they result in a tumor suppressor effect, frequent mutation of these sequences can occur, as shown in the current work, thus representing the Achilles' heel of the MSI-driven tumorigenic process. Mutation of *HSP110* T₁₇ is detected in 53% of MSI adenomas—a frequency that is comparable to mutation to *TGFBR2* and is an early event in the MSI-driven pathway to cancer²⁴. Nevertheless, these alterations frequently consist of small allelic deletions that may have little effect on HSP110ΔE9 expression in these premalignant tumors. In contrast, all MSI tumors were mutated at T₁₇ and showed accumulation of HSP110ΔE9 at variable levels. Although *HSP110* T₁₇ mutation is an early event, it may therefore impact upon HSP110 function in only a few adenomas. Our hypothesis is that it acts as an anticancer event at a later stage in the progression of MSI colorectal tumors. Those with high expression of HSP110ΔE9 mRNA represent about 30–40% of all subjects with MSI colon tumors. The closely related HSP110ΔE9/HSP110wt mRNA ratios of 75% and 50% were chosen in the two independent series we analyzed, as they maximized the difference in survival between subjects with MSI-HSP110ΔE9^{high} and MSI-HSP110ΔE9^{low}. In line with our *in vitro* transient experiments that showed a progressive

and dose-dependent proapoptotic effect of HSP110ΔE9 in CRC cells, the 'protective' clinical effect of HSP110ΔE9 is also expected to be progressive and dose dependent, so that the choice of a cutoff point, whatever its threshold, is somewhat artificial. Under these conditions, subjects with MSI-HSP110ΔE9^{high} stage 3 CRC showed excellent survival and response to chemotherapy. This was not observed for subjects with stage 2 MSI CRC, however, presumably because of the low frequency of disease recurrence in this group.

Overall, our results are suggestive of clinical heterogeneity in people with MSI CRC due to a dose-dependent effect of tumor HSP110ΔE9 expression. Because this mutant protein is expressed at variable levels in almost all MSI CRCs, it is likely to constitute a crucial determinant

Table 1 Association of clinical and molecular annotations to outcome (disease-free survival) of MSI CRC patients in univariate and multivariate Cox analyses

Annotation	Value	Univariate			Multivariate		
		H.R.	95% C.I.	P value	H.R.	95% C.I.	P value
Expression HSP110ΔE9/HSP110	Low	8.9	1.2–68	0.035	11.3	1.5–87	0.020
TNM stage	TNM 3	3.1	1.1–8.9	0.038	4.0	1.4–12	0.011
Age	≥70	2.8	0.95–8.4	0.063			
Age at diagnosis	–	1	1–1.1	0.073			
Gender	M	1.2	0.42–3.5	0.71			
Tumor location	Right colon	1.3	0.17–10	0.78			
HNPCC	Yes	0.91	0.31–2.7	0.87			
CIMP	Positive	0.44	0.062–3.1	0.41			
CIN	High	4.2 × 10 ^{−9}	0–Inf	0.32			
KRAS gene mutation status	Wild type	0.24	0.033–1.7	0.16			
BRAF gene mutation status	Wild type	1.5	0.15–14	0.73			
GRB14 gene mutation status	Wild type	0.17	0.019–1.5	0.11			
RAD50 gene mutation status	Wild Type	5.3	0.59–48	0.14			
BAX gene mutation status	Wild type	3.8	0.42–34	0.23			
TCF4 gene mutation status	Wild type	2.5	0.28–22	0.42			
IGF2R gene mutation status	Wild type	0.78	0.13–4.7	0.78			
CACNA1G methylation status	Unmethylated	2.8	0.39–20	0.31			
NEUROG1 methylation status	Unmethylated	2.8	0.39–20	0.31			
RASSF1 methylation status	Unmethylated	2.3E+08	0–Inf	0.39			
p16 methylation status	Unmethylated	0.55	0.078–3.9	0.56			
SOCS1 methylation status	Unmethylated	0.6	0.063–5.8	0.66			
RUNX3 methylation status	Unmethylated	0.65	0.092–4.7	0.67			
IGF2 methylation status	Unmethylated	1.2	0.17–8.7	0.84			
MGMT methylation status	Unmethylated	0.9	0.15–5.4	0.91			
MLH1 methylation status	Unmethylated	0.91	0.15–5.4	0.92			
p14 ARF methylation status	Unmethylated	0.9	0.093–8.7	0.93			

CIMP, CpG island methylator phenotype; CIN, chromosomal instability; HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer; H.R., Cox hazard ratio; 95% C.I., 95% confidence interval of H.R. value; modality of the annotation associated to H.R. Multivariate analysis includes only variables that are significant in the univariate analysis (*P* value < 0.05). Shaded boxes indicate significant results (*P* < 0.05).

of prognosis and treatment response in these tumors. We defined a subgroup of subjects with MSI-HSP110ΔE9^{high} that represented approximately one third of all subjects with MSI CRC and who showed excellent survival and response to chemotherapy. A key question will be to determine whether distinct therapeutic protocols could be proposed for persons with MSI CRC showing high or low expression of HSP110ΔE9. In our cohort it was not possible to look separately at those who received 5-FU alone, as most subjects received a combination therapy. Because subjects with MSI-HSP110ΔE9^{high} represent only a small fraction of persons with MSI CRC, these data do not contradict previous results demonstrating that, overall, subjects with MMR-deficient CRC have a worse response to 5-FU than those with MMR-proficient CRC. They are suggestive of clinical heterogeneity in the group of people with MSI regarding response to this drug. We anticipate that HSP110ΔE9 should also show aberrant expression in MSI cancers from other primary locations such as stomach, endometrium and other more recently reported sites²⁵. The targeting of HSPs has also emerged as an interesting sensitization strategy in cancer therapy. Different inhibitors of HSP90, HSP27 and HSP70 (ref. 26) are currently being evaluated in persons with cancer, with some already in phase 2 or 3 clinical trials²⁷. Interestingly, the present work is the first report to our knowledge of an HSP inhibitor that is produced endogenously by the cell. In the future, designing small peptides that mimic the sensitizing function of HSP110ΔE9 and could therefore be readily adapted to improve the treatment of both MSI and MSS tumors may constitute viable therapeutic strategies.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/naturemedicine/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Medicine website.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Carte d'Identité des Tumeurs (CIT) program (<http://cit.ligue-cancer.net/>) from the Ligue Nationale Contre le Cancer and by grants from the Fondation de France (Ref. RAF08005DDA to A.D.), the Institut National du Cancer (INCa) (to A.D. and C.G.), the Conseil Régional de Bourgogne (to C.G.) and the European Commission Seventh Framework Programme (SPEDOC 248835 to C.G.). C.G.'s group is known as 'La Ligue Contre le Cancer'. A.C. is a recipient of an INCa fellowship. We thank B. Iacopetta for critical reading of the manuscript. We thank E. Roux, A. Hamman, E. Fourmaux and E. Bergman for their technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.D. carried out analyses of aberrant splicing events due to MSI in CRC and genetic study of HSP110 in CRC cells and primary tumors. A.d.T. carried out analyses of wild-type and mutated HSP110 chaperone functions in CRC cells. A.C., M.S., A.L., K.W. and O.B. assisted with the mutational screening of primary CRC. J.G. (with G.J. and A.L.J.) carried out mouse work. L.M. carried out the clinical study and survival analyses. H.Z. and E. Tubacher assisted with the *in silico* search of candidate genes containing intronic microsatellite sequences. V.P.-L., S.K., J.S., G.M., M.-C.E.-G., L.B.-L., C.L., C.T., J.H.L., Y.P., E. Turet, J.-F.F. and M.-P.G. provided CRC samples and clinical data. A.D. and C.G. conceived the project, coordinated and directed the study, and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturemedicine/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

1. Thibodeau, S.N., Bren, G. & Schaid, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* **260**, 816–819 (1993).
2. Aaltonen, L.A. *et al.* Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* **260**, 812–816 (1993).
3. Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363**, 558–561 (1993).
4. Duval, A. & Hamelin, R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res.* **62**, 2447–2454 (2002).
5. Walther, A., Houlston, R. & Tomlinson, I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* **57**, 941–950 (2008).
6. Giannini, G. *et al.* Mutations of an intronic repeat induce impaired MRE11 expression in primary human cancer with microsatellite instability. *Oncogene* **23**, 2640–2647 (2004).
7. Sargent, D.J. *et al.* Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3219–3226 (2010).
8. Zaan, A. *et al.* Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann. Oncol.* **21**, 772–780 (2010).
9. Yamagishi, N., Saito, Y. & Hatayama, T. Mammalian 105 kDa heat shock family proteins suppress hydrogen peroxide-induced apoptosis through a p38 MAPK-dependent mitochondrial pathway in HeLa cells. *FEBS J.* **275**, 4558–4570 (2008).
10. Hosaka, S. *et al.* Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces apoptosis of various cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci.* **97**, 623–632 (2006).
11. Yamagishi, N., Ishihara, K., Saito, Y. & Hatayama, T. Hsp105 family proteins suppress staurosporine-induced apoptosis by inhibiting the translocation of Bax to mitochondria in HeLa cells. *Exp. Cell Res.* **312**, 3215–3223 (2006).
12. Siatskas, C., Underwood, J., Ramezani, A., Hawley, R.G. & Medin, J.A. Specific pharmacological dimerization of KDR in lentivirally transduced human hematopoietic cells activates anti-apoptotic and proliferative mechanisms. *FASEB J.* **19**, 1752–1754 (2005).
13. Kai, M. *et al.* Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol. Rep.* **10**, 1777–1782 (2003).
14. Slaby, O. *et al.* Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncol. Rep.* **21**, 1235–1241 (2009).
15. Trott, A., Shaner, L. & Morano, K.A. The molecular chaperone Sse1 and the growth control protein kinase Sch9 collaborate to regulate protein kinase A activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **170**, 1009–1021 (2005).
16. Andréasson, C., Fiaux, J., Rampelt, H., Druffel-Augustin, S. & Bukau, B. Insights into the structural dynamics of the Hsp110–Hsp70 interaction reveal the mechanism for nucleotide exchange activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 16519–16524 (2008).
17. Wang, X.Y. *et al.* Targeted immunotherapy using reconstituted chaperone complexes of heat shock protein 110 and melanoma-associated antigen gp100. *Cancer Res.* **63**, 2553–2560 (2003).
18. Manjili, M.H. *et al.* Development of a recombinant HSP110-HER-2/neu vaccine using the chaperoning properties of HSP110. *Cancer Res.* **62**, 1737–1742 (2002).
19. Manjili, M.H. *et al.* HSP110-HER2/neu chaperone complex vaccine induces protective immunity against spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *J. Immunol.* **171**, 4054–4061 (2003).
20. Ceballos, E. *et al.* Inhibitory effect of c-Myc on p53-induced apoptosis in leukemia cells. Microarray analysis reveals defective induction of p53 target genes and upregulation of chaperone genes. *Oncogene* **24**, 4559–4571 (2005).
21. Gotoh, K. *et al.* Apg-2 has a chaperone-like activity similar to Hsp110 and is overexpressed in hepatocellular carcinomas. *FEBS Lett.* **560**, 19–24 (2004).
22. Suraweera, N. *et al.* Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* **123**, 1804–1811 (2002).
23. Buhard, O. *et al.* Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J. Clin. Oncol.* **24**, 241–251 (2006).
24. Grady, W.M. *et al.* Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res.* **58**, 3101–3104 (1998).
25. Duval, A. *et al.* The mutator pathway is a feature of immunodeficiency-related lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 5002–5007 (2004).
26. Rérole, A.L. *et al.* Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anticancer chemotherapy. *Cancer Res.* **71**, 484–495 (2011).
27. Jegu, G., Hazoume, A., Seigneure, R. & Garrido, C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.* published online, doi:10.1016/j.canlet.2010.10.014 (13 November 2010).

ONLINE METHODS

Tumor samples, cell lines. CRC cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (see <http://www.cephb.fr/fr/gacc/>). Primary tumors and normal colonic tissues were obtained from patients undergoing surgery. The MSI status was determined as described²³.

Selection of candidate genes containing intronic DNA repeats. Criteria for selection of candidate genes containing intronic DNA repeats whose instability due to MSI might generate exon skipping or exon retention were: (i) size of intronic repeat (IR) > 7 nucleotides (nt); (ii) beginning of IR < 40 nt before the intron-exon junction; (iii) 'cancer-related' genes; and (iv) genes expressed in CRCs.

Mutation analysis. Tumor DNA from samples was extracted using QIAamp DNA Tissue Kit (Qiagen). Specific primers for HSP110 intron 8 were designed using e-primer3 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/eprimer3.html>). PCR reactions were done in a final volume of 20 μ l containing 100 ng of genomic DNA, 0.15–0.40 μ M of each primer and 1 unit of HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen). The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 94 °C for 10 min and 40 cycles at 94 °C for 30 s and 57 °C for 30 s. Fluorescent PCR products were run on the ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Real-time quantitative RT-PCR analysis. Total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen). RNA integrity was evaluated on a 2100 Bioanalyzer using the RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent). Only samples with intact RNAs were used (28S:18S RNA ratio >1.6, absence of aberrant peaks). Complementary DNAs were synthesized using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). For quantitative RT-PCR, we used the Applied SDS Biosystems analysis software. Primers (5'-GCTACACGAATTCCAGCTGTGA-3' and 5'-GAGCAGCATGGTTTCGACTAAA-3') and internal probes were designed using Primer Express (Applied Biosystems) and synthesized by Applied Biosystems. Internal probes were designed to amplify either the HSP110wt (5'-6FAM-TACAGTGTGCAATACTT-3') or HSP110 Δ E9 (5'-VIC-ATGTGCATTACAGTGTTTC-3') transcripts, allowing competitive detection of HSP110wt and HSP110 Δ E9 transcript. The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95 °C, 10 min, 40 cycles at 95 °C, 15 s, and 60 °C, 1 min.

Plasmids, transfections and immunofluorescence. HSP70 and HSP27 constructs were described elsewhere^{28,29}. The GFP-HSP110 construct was obtained from Addgene. The HSP110 mutant was produced by PCR from GFP-HSP110 vector using the following primers: 5'-CGC GCG CGC AAG ATC TAC ATG TCG GTG GTG GGG-3' (BglII) and 5'-CGC GCG CGC AAG CTT TCA TGA ACA CTG TAA TGC ACA TCC-3' (HindIII). After digestion, mutant HSP110 cDNA was cloned into the EGFP C2 vector. Transfections were done using the Jet PEI reagent (Ozyme). GFP fluorescence was assessed using the Cell Observer station (Zeiss). HSP110 chaperone activity was evaluated using a protein thermostability assay²⁶.

Immunoprecipitation and western blotting. Cytosolic and nuclear extractions were obtained as described²⁸. GFP immunoprecipitates were separated in SDS-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad). Membranes were first probed using primary antibodies: HA tag (Eurogentec), 14-3-3 (Santa-Cruz, TebuBio), HSP110 (N terminus, ab24503; Abcam), HSP110 (C terminus; BD Biosciences) and GFP tag (Millipore). Next, membranes were incubated with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Cell death analysis. Cells (1.5×10^5 cells per well), seeded onto 12-well culture plates, were treated with TRAIL (150–500 ng ml⁻¹) for 4 h, and cell death was measured by Hoechst 33342 staining (Sigma-Aldrich). Following treatment for 48 h with oxaliplatin (20–40 μ M), cells were incubated with antibody specific to Apo 2.7 and apoptotic cells were analyzed by flow cytometry (Becton Dickinson).

Tumor growth analysis *in vivo*. Control and HSP110 Δ E9-transfected HCT116 cells (4×10^6) were mixed with Matrigel (ref.: 354234; BD Biosciences) and injected s.c. into the right flank of *nu/nu* C57/BL6 mice (Charles River Laboratories). The mice were treated according to the guidelines of the Ministère de la Recherche et de la Technologie, France.

Subjects. Subjects with MSI CRC included those who underwent curative surgical resection of histologically proven MMR-deficient CRC (period: 1998–2003 and 2004–2007 for series 1 and 2, respectively) and for whom clinical data were available and tumor tissue could be retrieved from the tumor collection. Samples from the first series were initially collected to do microarray analyses so that they all contained at least 50% of tumor cells. The study was conducted according to the recommendations of the institutional authorities. All patients underwent surgery at either the Saint-Antoine Hospital (Paris, France), or Clinical Centre de Haute-pierre (Strasbourg, France). Subjects with MSI CRC were treated with FL (fluorouracil plus leucovorin), either alone or in combination with other drugs like oxaliplatin (Supplementary Table 3). Recurrence was uniformly assessed by physical examination with biological tests and measurement of carcinoembryonic antigen level, pulmonary radiography, and abdominal ultrasonography or computed tomography every 3 months during the first 3 years after surgery, then every 6 months for 2 years, and then annually. Patient follow-up was defined as the time between surgery and the last hospital contact or disease recurrence.

Statistical analyses. Differences between variables were assessed with the χ^2 or Fisher's exact test, and comparisons of the means with the Student's *t* test. Survival curves were obtained using Kaplan-Meier estimates. For survival curves the log-rank test with an end point at 5 years was used. Univariate and multivariate associations to outcome were done using the Cox regression model.

28. Brunet Simioni, M. *et al.* Heat shock protein 27 is involved in SUMO-2/3 modification of heat shock factor 1 and thereby modulates the transcription factor activity. *Oncogene* **28**, 3332–3344 (2009).

29. Ribeil, J.A. *et al.* Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **445**, 102–105 (2007).

ARTICLE 2

Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T₁₇ have improved response to 5-Fluorouracil-based chemotherapy.

Gastroenterology (2014)

Patients With Colorectal Tumors With Microsatellite Instability and Large Deletions in HSP110 T₁₇ Have Improved Response to 5-Fluorouracil–Based Chemotherapy

Ada Collura,^{1,2} Anaïs Lagrange,^{1,2} Magali Svrcek,^{1,2,3,4} Laetitia Marisa,⁵ Olivier Buhard,^{1,2} Agathe Guilloux,^{1,2} Kristell Wanherdrick,^{1,2} Coralie Dorard,^{1,2} Anna Taieb,^{1,2} Arnaud Saget,^{1,2} Marie Loh,⁶ Richie Soong,⁶ Nikolajs Zeps,^{7,8} Cameron Platell,^{7,8} Andrew Mews,^{7,8} Barry Iacopetta,⁸ Aurélie De Thonel,^{9,10} Renaud Seigneuric,^{9,10} Guillaume Marcion,^{9,10} Caroline Chapusot,¹¹ Come Lepage,¹² Anne-Marie Bouvier,¹² Marie-Pierre Gaub,¹³ Gérard Milano,¹⁴ Janick Selves,¹⁵ Patrick Senet,¹⁶ Patrice Delarue,¹⁶ Hayat Arzouk,^{17,18,19,20} Claire Lacoste,^{17,18,19,20} Arnaud Coquelle,^{17,18,19,20} Leila Bengrine-Lefèvre,²¹ Christophe Tournigand,²¹ Jérémie H. Lefèvre,^{2,22} Yann Parc,^{2,22} Denis S. Biard,²³ Jean-François Fléjou,^{1,2,3,4} Carmen Garrido,^{9,10,24} and Alex Duval^{1,2}

¹INSERM, Unité Mixte de Recherche Scientifique 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe "Instabilité des Microsatellites et Cancers," Equipe Labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France; ²Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France; ³AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France; ⁴Plateforme de Microdissection de l'Institut Fédératif de Recherche 65 et Tumorothèque des Hôpitaux Universitaires Paris-Est, Paris, France; ⁵Programme "Cartes d'Identité des Tumeurs," Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France; ⁶Cancer Science Institute of Singapore, National University of Singapore, Singapore; ⁷Bendat Family Comprehensive Cancer Centre, St John of God HealthCare, Subiaco, Australia; ⁸School of Surgery, University of Western Australia, Nedlands, Australia; ⁹INSERM, Unité Mixte de Recherche Scientifique 866, Dijon, France; ¹⁰University of Burgundy, Esplanade Erasme, Dijon, France; ¹¹Service de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire, Dijon, France; ¹²Burgundy Cancer Registry, INSERM U866, Burgundy University, Dijon University Hospital, Dijon, France; ¹³INSERM, U682, Développement et Physiopathologie de l'Intestin et du Pancréas, Strasbourg, France; ¹⁴Laboratoire d'Oncopharmacologie, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France; ¹⁵INSERM, Unité 563, Centre de Recherche sur le Cancer de Toulouse, France; ¹⁶UMR 6303 Centre National de la Recherche Scientifique-Université de Bourgogne, Dijon, France; ¹⁷IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, France; ¹⁸INSERM, U896, Montpellier, France; ¹⁹Université Montpellier, Montpellier, France; ²⁰Institut Régional du Cancer Montpellier, Montpellier, France; ²¹Service d'Oncologie Médicale, Hôpital Henri Mondor, Université Paris Est, Créteil, France; ²²AP-HP, Service de Chirurgie Générale et Digestive, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; ²³Centre d'Etude Atomique, Direction des Sciences du Vivant, Institut des Maladies Emergentes et des Thérapies Innovantes, Service d'Etude des Prions et des Infections Atypiques, Fontenay-aux-Roses, France; ²⁴Anticancer Center Georges François Leclerc, Dijon, France

BACKGROUND & AIMS: Patients with colorectal tumors with microsatellite instability (MSI) have better prognoses than patients with tumors without MSI, but have a poor response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. A dominant-negative form of heat shock protein (HSP)110 (HSP110DE9) expressed by cancer cells with MSI, via exon skipping caused by somatic deletions in the T₁₇ intron repeat, sensitizes the cells to 5-fluorouracil and oxaliplatin. We investigated whether HSP110 T₁₇ could be used to identify patients with colorectal cancer who would benefit from adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil and oxaliplatin. **METHODS:** We characterized the interaction between HSP110 and HSP110DE9 using surface plasmon resonance. By using polymerase chain reaction and fragment analysis, we examined how the size of somatic allelic deletions in HSP110 T₁₇ affected the HSP110 protein expressed by tumor cells. We screened 329 consecutive patients with stage II–III colorectal tumors with MSI who underwent surgical resection at tertiary medical centers for HSP110 T₁₇. **RESULTS:** HSP110 and HSP110DE9 interacted in a 1:1 ratio. Tumor cells with large deletions in T₁₇ had increased ratios of HSP110DE9:HSP110, owing to the loss of expression of full-length HSP110. Deletions in HSP110 T₁₇ were mostly biallelic in primary tumor samples with MSI. Patients with stage II–III cancer who received chemotherapy and had large HSP110 T₁₇

deletions (≥ 5 bp; 18 of 77 patients, 23.4%) had longer times of relapse-free survival than patients with small or no deletions (≤ 4 bp; 59 of 77 patients, 76.6%) in multivariate analysis (hazard ratio, 0.16; 95% confidence interval, 0.012–0.8; $P = .03$). We found a significant interaction between chemotherapy and T₁₇ deletion ($P = .009$). **CONCLUSIONS:** About 25% of patients with stages II–III colorectal tumors with MSI have an excellent response to chemotherapy, due to large, biallelic deletions in the T₁₇ intron repeat of HSP110 in tumor DNA.

Keywords: Therapeutic Response; Prognostic Factor; Outcome; Treatment.

Colorectal cancer (CRC) is the second most common cause of cancer-related death worldwide. CRC is a

Abbreviations used in this paper: CRC, colorectal cancer; DT, deletion status; EBV, Epstein-Barr Virus; 5-FU, 5-fluorouracil; HSP, heat shock protein; MMR, mismatch repair; mRNA, messenger RNA; MSI, microsatellite instability; MSS, microsatellite stability; PCR, polymerase chain reaction; RFS, relapse-free survival; WT, wild-type.

molecularly heterogeneous disease, with the majority of cases (80%–85%) displaying chromosomal instability in conjunction with microsatellite stability (MSS). A significant fraction of patients (15%–20%) showed widespread instability at DNA repeats (microsatellite instability [MSI]), owing to a defective mismatch repair (MMR) system.^{1–3} Clinically, MSI tumors have been reported to show improved prognosis but a bad response to 5-fluorouracil (5-FU)-based chemotherapy.^{4–6}

In a recent study, we reported specific mutation of the molecular chaperone HSP110 in MSI CRC.⁷ In colon cancers, chaperone proteins including HSP110 promote the survival of malignant cells.^{8–10} We provided evidence that an HSP110 mutant, referred to as *HSP110DE9*, was specifically expressed in MSI CRCs. This protein was generated from an aberrantly spliced messenger RNA (mRNA) lacking exon 9, thus encoding a truncated HSP110 protein. HSP110DE9 was found to abrogate the chaperone activity of HSP110 in a dominant-negative manner. Its forced overexpression caused MSI CRC cells to become sensitized to 5-fluorouracil and oxaliplatin. A fraction of stage II–III MSI CRC patients showing high tumor expression of HSP110DE9 had a significantly longer relapse-free survival (RFS) compared with those with low expression.⁷ However, these last results were preliminary because they were based on the analysis of a small series of MSI CRC patients treated at a single center.

One of the most tantalizing questions raised by our previous study is whether *HSP110* mutation provides a mechanistic basis for the possibility that a fraction of MSI CRCs displaying high expression of mutant HSP110DE9 relative to HSP110 wild-type (wt) might be more responsive to chemotherapy. We have shown in earlier work that aberrant expression of HSP110DE9 in MSI cancer cells was associated with somatic deletion of the T₁₇ repeat within intron 8 of *HSP110*.⁷ Decreasing length of the *HSP110* T₁₇ repeat was likely to correlate with increased synthesis of HSP110DE9 as a result of exon 9 skipping. Nevertheless, such a correlation was not precisely examined in primary tumor samples. In the present study, we investigated whether the mutation status of *HSP110* T₁₇ might be useful to identify a fraction of CRC patients who would benefit from adjuvant chemotherapy. Results obtained indicated that accurate measurement of the *HSP110* T₁₇ deletion in tumor DNA was likely to constitute an unbiased way to evaluate the HSP110DE9/HSP110 ratio in tumor cells and the clinical impact of *HSP110* status in MSI colon cancer patients.

Materials and Methods

Ethics Statement

This study was approved by the institutional review boards/ethics committees of the participating centers. Informed consent was recorded in each case. Patients who received preoperative chemotherapy and/or radiation therapy were excluded from this study.

Surface Plasmon Resonance

Kinetics and affinity-constant measurements of HSP110DE9/HSP110wt interaction were performed in a BIAcore BX100 (GE

Healthcare, Dijon, France). All experiments were performed with immobilized His-tagged HSP110 (10 µg/mL) using an nitrilotriacetic acid sensor chip at 25°C. For affinity-constant determination, curves were analyzed with a global fit of 1:1 binding model with a drifting baseline.

Modeling Human HSP110 and the Protein–Protein Interface HSP110/HSP110DE9

The structures of human (h)HSP110 and HSP110DE9 were built by homology using the experimental structure of yeast Hsp110 Sse1 (Protein Data Bank code: 3C7N)¹¹ as a template for the software MODELLER.¹² The models were fitted with 3C7N and relaxed by molecular dynamics simulations. We used the 3C7N monomer A to produce a set of 3-dimensional models for HSP110 and HSP110DE9 sequences. All-atom molecular dynamics simulations in explicit water were performed with the GROMACS software package using the GROMOS96 ffG43a1 force field and the Simple Point Charge water model (Hochschulverlag AG, Zurich, Switzerland). The time step (0.001 pico second [ps]) and the list of neighbors were updated every 0.005 ps with the grid method and a cut-off radius of 1 nm. The coordinates of all the atoms in the simulation box were saved every 2 ps. The initial velocities were chosen randomly. We used the NPT ensemble with a cubic box of initial side equal to 15.754 nm with 125,055 Simple Point Charge water molecules, keeping a minimum distance of 0.9 nm between the solute and each face of the box. The charge of hHSP110-HSP110DE9 was neutralized by adding 19 Na⁺ counter-ions. The temperature and pressure were kept using the Berendsen method and isotropic coupling for the pressure (T = 310K, τ_T = 0.1 ps; P₀ = 1 bar, coupling time τ_P = 1 ps). The electrostatic term was computed using the Particle Mesh Ewald algorithm (radius, 1 nm) with the fast Fourier transform optimization. The cut-off algorithm was applied for the noncoulomb potentials with a radius of 1 nm. The production period was 70 ns.

Extensive Analysis of a Panel of HCT116 Subclones for Both HSP110DE9/HSP110wt mRNA Expression Ratio and T₁₇ Deletion Status

The HCT116 cell line was cultured in Dulbecco's modified Eagle media as described.⁷ Single-cell subcloning was performed using MoFlo Astrios (Beckman Coulter, Paris, France), spotting 1 cell/well in 96-well plates containing 200 µL of Dulbecco's modified Eagle media. The HSP110DE9/HSP110wt mRNA expression ratio was evaluated from 10⁶ cells of each single HCT116 cell subcloned line. Total RNA was purified with an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Netherlands). Complementary DNAs were synthesized using the High-Capacity Complementary DNA reverse-transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Primers, internal probes, and thermal cycling conditions were used as described.⁷ DNA from each single HCT116 cell subcloned line was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

Western Blotting

Total protein extractions were obtained from adherent cells lysed with 1× Laemli sample buffer (BioRad, Hercules, CA). Protein extractions were treated with a DNase set (Qiagen). Proteins

were separated in sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels and transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond ECL; GE Healthcare). Membranes were first probed using the following primary antibodies: HSP110 (EPR4576; Abcam), HSC70 (13D3; Abcam, Paris, France), and 14-3-3 (Santa Cruz, CA). Next, membranes were incubated with secondary horseradish-peroxidase-coupled antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, United Kingdom) before revelation.

Epstein-Barr Virus-Based Vector Construction

We introduced HSP110wt or HSP110DE9 mutant open reading frames into puromycin-resistant Plasmid EBV (pEBV) plasmids¹³ downstream of a CAG promoter (pEBVCAG-puro or pBD2347, unpublished data) to obtain pEBVCAG-HSP110wt-puro (pBD2640) and pEBVCAG-HSP110DE9-puro (pBD2570) plasmids, respectively. For polymerase chain reaction (PCR) amplification, we used the same forward primer for both constructs (5'-ATGTCGGTGGTGGGTTGGACGTGGGC-3'). As reverse primers, we used 5'-CTAGTCCAAGTCCATATTAACAGAATT-3' for HSP110wt and 5'-TCATGAACACTGTAATGCACATCC-3' for HSP110DE9. Cells were transfected with JetPrime (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) according to the manufacturer's recommendations. Twenty-four hours later, cell medium was supplemented with puromycin (0.5 µg/mL for HCT116 or 2.0 µg/mL for SW480 and FET cell lines).

Chemosensitivity Assay

Rates of sensitivity to 5-fluorouracil and oxaliplatin were assessed using WST-1 (Roche, Mannheim, Germany). Briefly, 2×10^4 cells of each cell line were plated per well in 24-well plates in 2 mL of media with or without drugs. After 72 hours, WST-1 reagent was added and incubated for 4 hours at 37°C. The absorbance was measured at 450 nm. The reference wavelength was at 750 nm.

Patients and Specimens

We identified 329 patients who underwent surgical resection for histologically proven stage II or stage III MSI CRC from 1998 to 2007 in 1 of the 6 clinical centers involved in this study (Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; CHU de Dijon, Dijon, France; CHU de Toulouse Purpan, Toulouse, France; Centre Antoine Lacassagne, Nice, France; St John of God Pathology, Subiaco, Australia; National University Hospital, Singapore) (Supplementary Table 1). In all French clinical centers, MSI was identified prospectively at diagnosis using the pentaplex PCR method.^{14–18} The detection of MSI in tumors from Singapore and Australia was identified prospectively using immunohistochemistry during the same time period (1998–2007), but this was confirmed using the same PCR pentaplex method^{14,15} (Supplementary Table 1). In a subgroup of 166 patients, the methylation status of the *MLH1* promoter was examined (Supplementary Table 1). We also analyzed a retrospective cohort of 258 MSS CRC patients collected from the same clinical centers and matched for tumor stage, year of diagnosis, age, sex, and primary tumor location (Table 1 and Supplementary Table 1).

Extensive clinical follow-up evaluation and treatment details were available for all MSI CRC patients included in this study. The study was conducted according to the recommendations of the institutional authorities. Patients who received

adjuvant therapy ($n = 77$) were treated mainly with 5-fluorouracil-based chemotherapy (ie, 5-fluorouracil plus leucovorin), either alone (fluorouracil and leucovorin regimen, $n = 42$; fluorouracil and folinic acid regimen, $n = 2$) or in combination with other drugs (oxaliplatin, $n = 32$) (Supplementary Table 1; in 3 cases, the exact data concerning the 5-FU-based chemotherapy regimen were unknown, ie, 5-FU alone or in combination with oxaliplatin). Adjuvant chemotherapy systematically was proposed for stage III CRC patients and administered in the absence of contraindication. In stage II CRC patients, it was proposed in at risk individuals according to the following criteria: perforated cancer, pT4N0 with vascular emboli, and/or obstructive colorectal tumor, as reported.¹⁹ Recurrence was assessed uniformly, as follows: physical examination with biological tests and measurement of carcinoembryonic antigen level, chest radiograph, and abdominal ultrasonography or computed tomography every 3 months during the first 3 years after surgery, then every 6 months for 2 years, and then annually. The patient follow-up period was defined as the time elapsed between surgery and the last hospital contact or disease recurrence.

DNA Extraction From Primary Tumor Samples

We processed frozen tissues (30 mm³) using the QIAamp protocol (Qiagen). Formalin-fixed and paraffin-embedded tissues were processed as described.²⁰

Laser Capture Microdissection

Six serial, 5-mm, paraffin-embedded sections from 27 cases were cut and then mounted onto membrane slides (P.A.L.M. Membrane Slides, Bernreid, Germany), as described.¹⁷

Mutation Analysis of the HSP110 T₁₇ and Other Microsatellite Sequences Contained in Target Genes in Cohorts of Patients With MSI or MSS CRC

The polymorphic status of the *HSP110* T₁₇ repeat was evaluated in a series of 50 MMR-proficient lymphoblastoid cell lines from healthy controls (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain Institute, Paris, France) using PCR and fragment analysis (data not shown). The mutation status of *HSP110* T₁₇ initially was evaluated in the set of 98 MSI CRC samples from the Saint-Antoine Hospital that previously had been investigated for HSP110DE9 expression (MSI set 1).⁷ The mutation status of *HSP110* T₁₇ subsequently was examined in a second set of 231 MSI CRC samples from the 5 other clinical centers involved in this study (MSI set 2). The multicentered cohort of 258 MSS CRCs was used to evaluate whether *HSP110* T₁₇ mutations also occurred in MMR-proficient tumors. Table 1 summarizes the overall clinical features of patients and their tumor characteristics. A total of 15 other genes containing mononucleotide repeat sequences also were analyzed.^{21,22}

Statistical Analysis

All statistical analyses were stratified according to clinical centers to take into account the potential heterogeneity of different centers. RFS was used and this was defined as the time from surgery to the date of first recurrence (relapse or death from CRC) or last contact. Patients who were alive

Table 1. Description of MSI and MSS Cohorts Used in This Study

	MSI			MSS		<i>P</i> value MSI
	Set 1, n (%) (N = 98)	Set 2, n (%) (N = 231)	<i>P</i> value	Total, n (%) (N = 329)	Total, n (%) (N = 258)	
Sex						
Female	48 (49)	149 (65)	.0099	197 (60)	137 (53)	.11
Male	50 (51)	82 (35)		132 (40)	121 (47)	
Age at diagnosis	71	76	.023	75	73	.38
Tumor stage						
II	71 (73)	157 (68)	.36	229 (70)	187 (72)	.47
III	26 (27)	74 (32)		100 (30)	71 (28)	
Tumor location				n = 324		
Distal colon	25 (26)	45 (20)	.049	70 (22)	57 (22)	.91
Proximal colon	67 (69)	179 (79)		246 (76)	196 (76)	
Rectum	5 (5)	3 (1)		8 (2)	5 (2)	
Lynch syndrome				n = 166		
Yes	41 (43)	3 (4)	.003	44 (27)	0 (0)	<.001
No	54 (57)	68 (96)		122 (73)	258 (100)	
Chemotherapy performed						
Yes	23 (23)	54 (23)	.99	77 (23)	ND	NA
No	75 (77)	177 (77)		252 (77)	ND	
Chemotherapy type				n = 318		
FOLFOX	13 (13)	17 (8)		30 (9)	ND	
FUFOL	0 (0)	2 (1)		2 (1)	ND	
LV5FU2	10 (10)	32 (15)	.31	42 (13)	ND	NA
None	75 (77)	169 (77)		244 (77)	ND	
Others	0 (0)	0 (0)		0 (0)	ND	
Relapse						
Yes	11 (11)	60 (26)	.003	71 (22)	ND	NA
No	87 (89)	171 (74)		258 (78)	ND	
Median follow-up time, mo [IQR]	42 [21–51]	60 [29–60]	.009	50 [24–60]	ND	NA
Clinical center						
Australia	0 (0)	44 (19)		44 (13)	0 (0)	
Dijon	0 (0)	133 (49)		133 (34)	97 (38)	
Nice	0 (0)	14 (6)	<.001	14 (4)	20 (8)	<.001
Paris Saint-Antoine	98 (100)	0 (0)		98 (30)	104 (40)	
Singapore	0 (0)	50 (22)		50 (15)	35 (14)	
Toulouse	0 (0)	10 (4)		10 (3)	2 (1)	

FOLFOX, folinic acid, fluorouracil and oxaliplatin; LV5FU2, fluorouracil and leucovorin; FUFOL, fluorouracil and folinic acid; IQR, interquartile range; ND, not determined.

without relapse at the last follow-up evaluation were considered censored cases (ie, they were included in the at risk set in the survival probability estimations until they were lost to follow-up evaluation). Survival curves were obtained according to the method of Kaplan and Meier and differences between survival distributions were assessed by the log-rank test using an end point of 5 years. Univariate and multivariate models were computed using Cox proportional-hazards regression. For multivariate analyses, only those variables with information available for all sample groups were included in models. Interaction between *HSP110* T₁₇ deletions and adjuvant chemotherapy was assessed using the likelihood ratio test. Graphic and statistical methods were used to examine whether proportional hazards assumptions were satisfied.⁷ Survival analyses were performed using the R package survival.

The cut-off value that resulted in maximal survival differences between patient groups with large and small deletions in the *HSP110* T₁₇ was determined by the minimal *P* value approach. To overcome a possible false detection of a cut-off rate,

which is known to constitute a risk for this approach,²³ we first investigated the robustness of our 5-bp cut-off value using the bootstrap method. In addition, we applied the *P* value correction of Lausen and Schumacher (1996) to test for the existence of a threshold on the effect of *HSP110* T₁₇ deletions on RFS.

Differences between *HSP110* Del^L (large T₁₇ deletions) and Del^S (small T₁₇ deletions) groups and other clinical annotations were tested for statistical significance using the Cochran-Mantel-Haenszel chi-squared test for categorical variables, or an unpaired Student *t* test for continuous variables.

For all analyses, *P* values less than .05 were considered to indicate statistical significance.

Results

HSP110DE9/HSP110wt Interaction In Vitro

To better understand the molecular basis for any potential prognostic value of *HSP110DE9*, we studied the

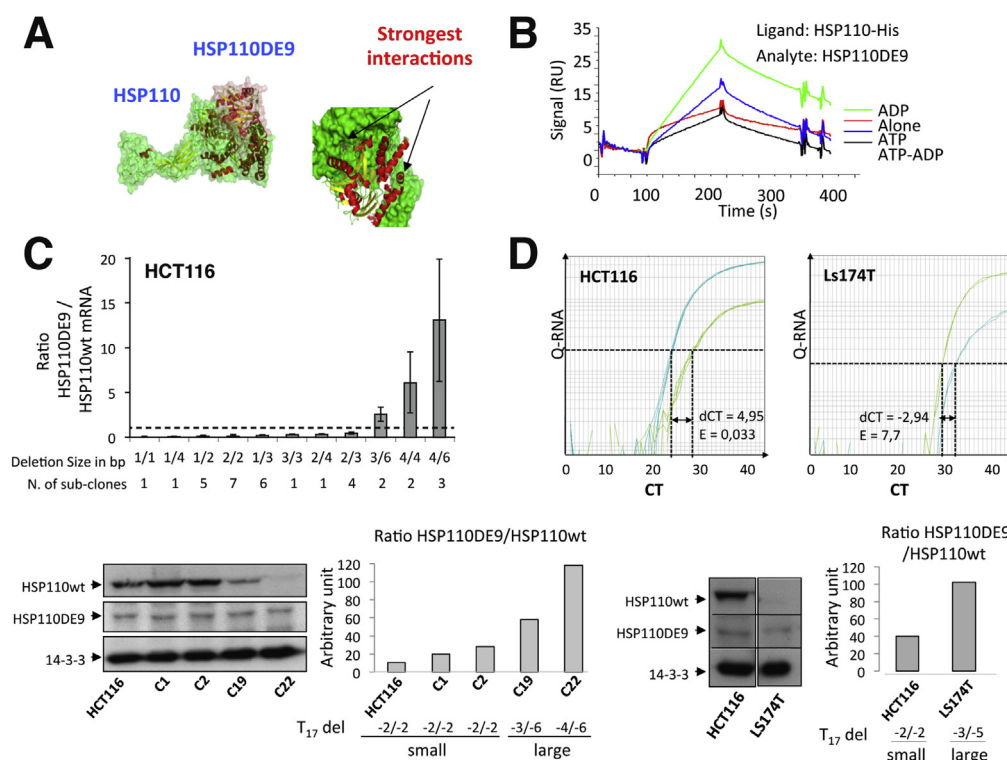


Figure 1. (A) Modeling of HSP110 and the protein-protein interface of HSP110DE9/HSP110wt. The HSP110 structure and mutant HSP110DE9 were built by homology using the experimental structure of yeast Hsp110 Sse1 (Protein Data Bank code: 3C7N) as a template in the software MODELLER. *Right panel*: details of the interaction surface with the strongest interaction sites highlighted. (B) Characterization of the HSP110/HSP110DE9 protein-protein interaction by surface plasmon resonance. His-tagged HSP110 was immobilized with an NTA sensor chip and HSP110DE9 was injected in running buffer alone (red curve), with adenosine diphosphate (ADP; 2 mmol/L, green curve), adenosine triphosphate (ATP; 2 mmol/L, blue curve), or both ATP and ADP (black curve). (C) *Top panel*: distribution of HSP110 T_{17} genotype CRC cell line and HSP110DE9/HSP110wt mRNA ratio in 33 HCT116 subclones. *Bottom left panel*: Western blotting analysis of 4 HCT116 subclones; *bottom right panel*: the ratio of HSP110wt/HSP110DE9 expression was calculated in each case. (D) Amplification plots corresponding to HSP110wt (blue curve) and HSP110DE9 (green curve) reverse-transcription PCR products in HCT116 (small T_{17} status) and LS174T (large T_{17} status). *Top panel*: results are expressed ($E = 2^{-\Delta\text{CT}}$) as n-fold difference in HSP110DE9 relative to HSP110wt expression (dCT), where dCT was determined by subtracting the average CT value of the HSP110DE9 mRNA from the average CT value of the HSP110wt mRNA. *Bottom left panel*: Western blotting analysis of HSP110wt and HSP110DE9 mutant proteins in 2 cell lines (HCT116 and LS174T); *bottom right panel*: the ratio of HSP110wt/HSP110DE9 expression was calculated in each case.

HSP110DE9/HSP110wt interaction by computer modeling and surface plasmon resonance (BIAcore). In silico determination showed that 1 molecule of HSP110DE9 interacted with one molecule of HSP110wt (Figure 1A). Our MD calculations indicated the HSP110 amino acids ASP⁶³³, GLN⁷⁰⁷, and GLU⁷⁰⁸ were essential for this interaction. Interestingly, these amino acids are located within the peptide-binding domain of HSP110wt (also called the *chaperone domain*), which could explain its inactivation through HSP110DE9 interaction. Likewise, our BIAcore studies also indicated a 1:1 association between HSP110wt and HSP110DE9 that was favored in the presence of adenosine di-phosphate (HSP110 has an adenosine tri-phosphate binding domain) (Figure 1B). Thus, HSP110wt and HSP110DE9 are able to physically interact with each other and they interact with each other in a 1:1 ratio.

HSP110DE9/HSP110wt Expression Ratio and T_{17} Deletion Status in MSI CRC Cell Lines

We analyzed a panel of 33 HCT116 subclones for their T_{17} deletion status (DT) (Figure 1C). A pronounced increase

in the expression of HSP110DE9/HSP110wt mRNA ratio was observed in subclones with 4 bp or larger T_{17} deletions (Figure 1C). In line with the mRNA results, a correlation also was observed at the protein level in 4 HCT116 subclones displaying small or large HSP110 T_{17} deletions (Figure 1C). HCT116 and LS174T displaying small or large T_{17} deletions also were analyzed and similar results were obtained (Figure 1D). Most likely, these results simply mean that the predominant product of the gene switches to HSP110DE9 as the deletion gets longer (≥ 4 bp). In both quantitative reverse-transcription PCR and Western blotting experiments, the difference in HSP110DE9/HSP110wt expression ratio between cell lines with small or large T_{17} deletions was caused mainly by a decrease in HSP110wt expression whereas the expression of HSP110DE9 stayed relatively similar. First, small deletions in T_{17} resulting from MSI allow the aberrant expression of HSP110DE9 through exon skipping. This is followed by the loss of expression of HSP110wt once the size of the deletion increases beyond a certain point.

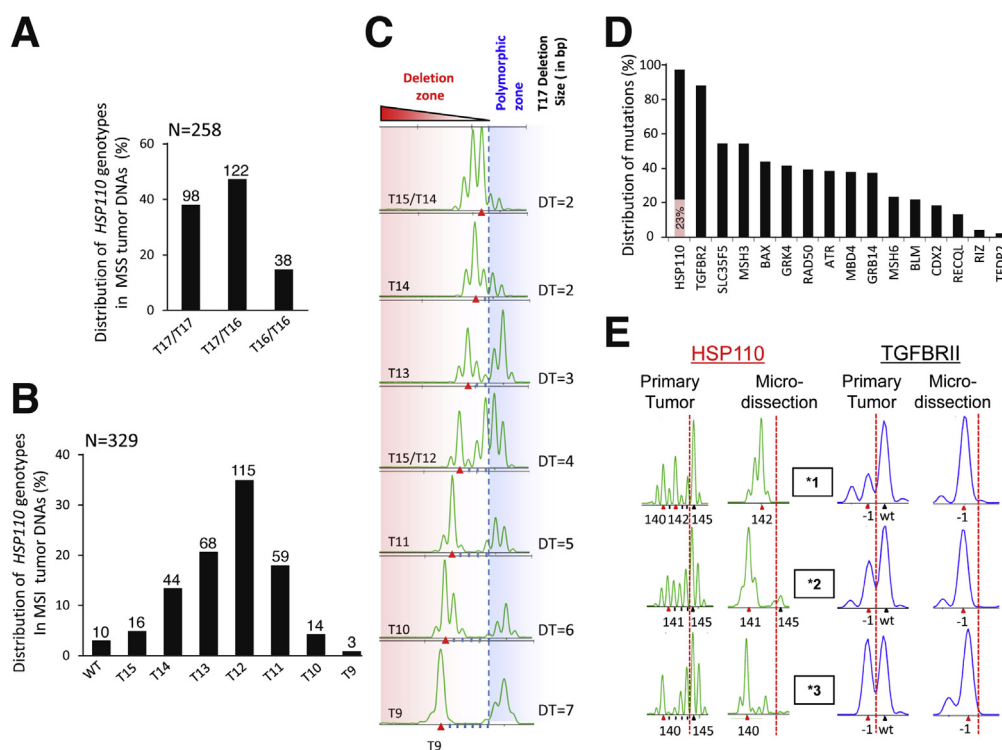


Figure 2. Fragment analysis of the intronic T_{17} in MSS and MSI primary colon tumors. (A) Distribution of *HSP110* T_{17} genotypes in 258 stage II and stage III MSS colorectal tumors (polymorphic zone). (B) Distribution of mutated *HSP110* T_{17} alleles in 329 stage II and stage III MSI CRCs. (C) Examples of 7 *HSP110* T_{17} mutated alleles. DT, size of T_{17} somatic deletions in tumor DNA (in bp). The polymorphic zone relates to the allelic variations observed for the *HSP110* T_{17} repeat in MSS patients. (D) Mutation of the intronic *HSP110* T_{17} and 15 other coding microsatellites contained in target genes for MSI in colon tumors. Although T_{17} deletions were observed in a great majority of MSI CRCs, 23% of them displayed large T_{17} deletions with a clinical impact in MSI CRC patients (ie, response to chemotherapy). (E) Left and right panels: Fragment analysis of *HSP110* T_{17} and *TGFBR2* A_{10} microsatellite profiles of 3 primary CRCs before and after microdissection.

HSP110 T_{17} Status of MSS and MSI CRCs

None of the 258 MSS CRCs investigated here was found to contain a mutation in the *HSP110* T_{17} repeat. In all cases, allelic lengths were either T_{16} or T_{17} (Figure 2A) and thus within the polymorphic zone observed in lymphoblastoid cell lines (data not shown). In contrast, the large majority of MSI tumors ($n = 319$ of 329; 97%) showed deletions of up to 7 base pairs that were outside the polymorphic zone ($P < .001$ compared with MSS; Figure 2B and C). For the majority of analyzed primary tumor samples, only one mutated allele type was detected and this corresponded to the main clonal population present in the tumors. For the cases that displayed multiallelic profiles, the peak associated with the larger T_{17} deletion that did not appear to result from a stuttering of Taq polymerase was used for classification purposes. The mutation frequencies of the 15 other genes representing reported targets for MSI-driven instability were highly variable in MSI colon tumors (Figure 2D).

HSP110 T_{17} Deletions Are Mostly Biallelic in MSI CRCs

The analysis of MSI CRC cell lines showed that the majority of these models ($n = 11$ of 13; 85%) displayed biallelic alterations with no remaining detectable wild-type *HSP110* T_{17} allele (Supplementary Figure 1A). Primary

tumor samples were not microdissected or even macrodissected. Therefore, the peaks corresponding to T_{17} alleles simply reflected what usually was observed when performing routine analysis of this DNA repeat in MSI primary CRCs. The presence of biallelic mutations for *HSP110* T_{17} was shown by first performing microdissection of 3 primary tumor samples that were highly contaminated with normal cells. We compared *HSP110* T_{17} and *TGFBR2* A_{10} mutation profiles, which display mainly biallelic mutations in MSI cancer cells,²⁴ before and after microdissection of the tumor tissue. In all 3 cases, microdissection led to disappearance of the *HSP110* and *TGFBR2* wild-type alleles (Figure 2E). We also compared the mutation profile of *HSP110* T_{17} with that of *TGFBR2* A_{10} and the pentaplex panel in 7 other primary tumors that displayed varying peak intensities for the wild-type T_{17} allele. The results showed a high overall level of correlation for the mutation status of all these DNA repeats (Supplementary Figure 1B). We confirmed these results by performing microdissection experiments on 24 additional primary CRCs (Supplementary Figure 1C). Sixteen primary tumor samples that contained low levels of contamination with normal cells also were found to display biallelic deletions in *HSP110* T_{17} , even without microdissection (Supplementary Figure 1D). Consequently, these results show that *HSP110* T_{17} deletions are usually biallelic in MSI primary colon tumors.

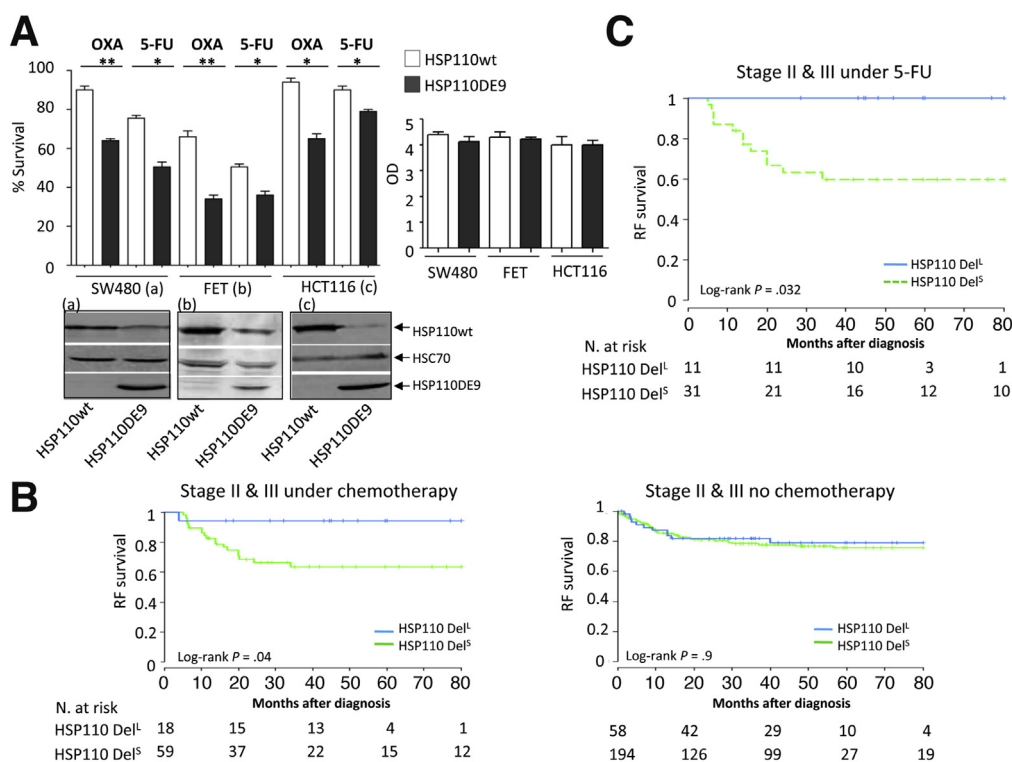


Figure 3. (A) *Left panel*: chemosensitivity assay using stably transfected MSI (HCT116) and MSS (SW480, FET) CRC cell lines that overexpressed HSP110wt or HSP110DE9 protein. *Right panel*: The absorbance values (optic density [OD]) obtained when plating the same number of untreated cells (SW480, FET, HCT116) that overexpressed either HSP110wt or HSP110DE9 are shown as controls. (B) Survival analysis of stage II and stage III MSI CRC patients treated with (*left panel*) or without (*right panel*) chemotherapy. Patients were classified into 2 groups according to the size of deletion in the T_{17} intronic repeat ($DT \geq 5$ bp, T_{11} , T_{10} , T_9 for MSI $HSP110$ Del^L patients; $0 \leq DT < 5$, T_{17} to T_{12} for MSI $HSP110$ Del^S patients). (C) Survival analysis of stages II–III MSI colorectal cancer patients according to the size of deletions in the T_{17} DNA repeat and who were treated with 5-fluorouracil alone. Forty-two MSI stage II and III CRC patients received adjuvant chemotherapy with 5-FU alone. All data are shown in [Supplementary Table 1](#). Other patients received 5-FU-based chemotherapy in which 5-FU was combined with oxaliplatin or other drugs.

Varied Chemosensitivity of Both MSI and MSS CRC Cell Lines Based on the Expression of HSP110DE9

We performed chemosensitivity assays using stably transfected MSI and MSS CRC cell lines that overexpressed HSP110wt or HSP110DE9 protein. Importantly, these cells were transfected using an EBV-based vector, allowing stable expression of genes.¹³ This allows the possibility to work with polyclonal models, thus avoiding the biases inherent with single-cell approaches. By using this method, we showed that both MSI (HCT116) and MSS (SW480 and FET, in which $HSP110$ T_{17} is not mutated) CRC cells became more sensitive to chemotherapy (5-FU, oxaliplatin) when they overexpressed HSP110DE9 as compared with HSP110wt ([Figure 3A](#)).

HSP110 T_{17} Mutation Status and the Survival of Stage II–III MSI CRC Patients

The first (MSI set 1) and the second sets (MSI set 2) of patients showed distinct clinical characteristics in terms of sex, age, and tumor location ([Table 1](#)). This was because the Saint-Antoine Hospital in Paris is a reference center for the

treatment of Lynch patients, whereas recruitment at the other clinical centers was enriched for elderly patients known to contain more women and sporadic MSI tumors. For each set, the threshold value for the size of $HSP110$ T_{17} deletions that resulted in a maximal survival difference between patient groups with long and short deletions was determined independently. In both sets, the same 5-bp deletion cut-off value identified that stages II–III MSI patients under chemotherapy with large deletions had excellent survival rates ([Supplementary Figure 2A](#)). The 329 MSI CRC patients therefore were classified into 2 groups displaying large deletions ($DT \geq 5$ bp; $HSP110$ Del^L; $n = 76$ of 329; 23%) or small deletions ($0 \leq DT \leq 4$; $HSP110$ Del^S; $n = 253$ of 329; 77%).

In the overall cohort, $HSP110$ T_{17} mutation status showed a trend for association with RFS in multivariate analysis (hazard ratio [HR], 0.57; 95% confidence interval, 0.29–1.1; $P = .096$; [Supplementary Table 2](#)). Tumor stages II–III patients who received chemotherapy and had large $HSP110$ T_{17} deletions ($n = 18$ of 77; 23.4%) showed excellent RFS compared with patients with small deletions (5-year RFS of 94% vs 64%, respectively; log-rank $P = .04$; [Figure 3B](#)) in multivariate analysis (hazard rate, 0.16; 95% confidence interval, 0.012–0.8; $P = .03$; [Table 2](#)). In contrast

Table 2. Association of Clinical and Molecular Annotations to Outcome (Relapse-Free Survival) for Patients Treated With Chemotherapy

Variable	Available data n (n relapse)	Cox univariate analysis				Cox multivariate analysis ^a			
		HR	(95% CI)	Modality P value (Wald)	Model P value (log-rank)	HR	(95% CI)	Modality P value (Wald)	Model P value (log-rank)
HSP110Del, large vs small	77 (20)	0.16	(0.02–1.2)	.073	.040	0.1	(0.012–0.8)	.03	.15
TNM stage, III	77 (20)	2.1	(0.66–6.5)	.21	.20	2.1	(0.54–8.1)	.29	
LV5FU2 chemotherapy	72 (17)	1.8	(0.56–5.6)	.33	.32	1.1	(0.32–3.9)	.87	
Tumor location, proximal colon	77 (20)	2.3	(0.66–8.1)	.19	.40	3.5	(0.89–14)	.074	
Tumor location, rectum		1.6	(0.16–15)	.7		1.4	(0.14–14)	.78	
Male sex	77 (20)	0.74	(0.28–1.9)	.53	.53	1.2	(0.33–4)	.82	
Age recoded, ≥75 y	77 (20)	0.73	(0.16–3.4)	.69	.69	0.73	(0.15–3.6)	.7	
Lynch syndrome	27 (6)	0.61	(0.1–3.7)	.59	.59				

HR, Cox hazard ratio; CI, confidence interval of HR; LV5FU2, fluorouracil and leucovorin.

^aMultivariate models included variables available for most samples. Therefore, the model was estimated on 72 patients (n relapse = 17).

and as expected because of the chemosensitizing effect of HSP110DE9, no significant influence of T₁₇ status was observed in stages II–III patients who did not receive chemotherapy (Supplementary Figure 2B). A significant interaction between chemotherapy and T₁₇ mutation status was observed in both univariate ($P = .03$ for interaction) and multivariate models ($P = .009$ for interaction) (Supplementary Table 3). The association between survival and T₁₇ deletion status remained significant in the subgroup of 42 patients treated with 5-fluorouracil alone (Figure 3C). The interaction between chemotherapy with 5-fluorouracil alone and T₁₇ mutation status also remained significant ($P = .014$ and $P = .007$ for interaction using univariate and multivariate models, respectively; data not shown).

No significant associations were found between the size of HSP110 T₁₇ deletions and tumor stage ($P = .89$), or the methylation status of the *MLH1* promoter ($P = .52$) (Table 3). The only positive association observed for the other clinical parameters was between HSP110 Del^L and proximal tumor location ($P = .026$; Table 3).

The Lausen and Schumacher corrected P value for stages II–III patients who received chemotherapy was .057 (data not shown). Although not reaching significance, it indicates a homogeneity with regard to RFS within the 2 groups displaying large or small deletions. When considering the other target genes for MSI (Figure 2D), we observed that, in each case, the difference in survival between MSI mutated and wild-type groups remained not significant for stages II–III patients who received chemotherapy (Table 4).

Discussion

In our previous study,⁷ we described the novel finding that a chaperone protein (ie, HSP110), was mutated in human colon cancer. We showed this mutation was specific and occurred frequently in MSI tumors, leading to abrogation of HSP110 chaperone activity and of its anti-apoptotic function. We present evidence showing that forced

overexpression of the HSP110DE9 mutant protein in CRC cell lines led to them becoming sensitized to chemotherapy. Finally, we used quantitative reverse-transcription PCR to

Table 3. Associations of Clinical Annotations to HSP110 Deletion Status in MSI Colorectal Cancer Patients

	HSP110 Del ^L , n (%) (N = 76)	HSP110 Del ^S , n (%) (N = 253)	P value
Sex			
Female	48 (63)	149 (59)	.43
Male	28 (37)	104 (41)	
Median age at diagnosis, y	77.5	74	.12
Tumor stage			
II	54 (71)	175 (69)	.89
III	22 (29)	78 (31)	
Tumor location			
Distal colon	10 (13)	60 (24)	
Proximal colon	65 (87)	181 (73)	.026
Rectum	0 (0)	8 (3)	
Relapse			
Yes	12 (16)	59 (23)	.37
No	64 (84)	194 (77)	
Chemotherapy performed			
Yes	18 (24)	59 (23)	.97
No	58 (76)	194 (77)	
Chemotherapy type			
FOLFOX	7 (9)	23 (9)	
FUFOL	0 (0)	2 (1)	.65
LV5FU2	11 (15)	31 (13)	
None	56 (76)	188 (77)	
Lynch syndrome			
Yes	12 (27)	32 (26)	.52
No	33 (73)	89 (74)	

HSP110 Del^{L/S}, large/small HSP110 deletion (DT ≥ 5 bp/DT < 5 bp); FOLFOX, folinic acid, fluorouracil and oxaliplatin; LV5FU2, fluorouracil and leucovorin; FUFOL, fluorouracil and folinic acid.

Table 4. Target Gene Mutations Detected in MSI Colorectal Cancer and Their Impact on Patient Survival (RFS)

Gene name	Mutation frequencies, %	Stages 2 and 3		Stage 2		Stage 3		Under chemotherapy	
		n/n.mut	P value, log-rank	n/n.mut	P value, log-rank	n/n.mut	P value, log-rank	n/n.mut	P value, log-rank
<i>TGFB2</i>	88%	185/162	.22	130/111	.87	55/51	.25	46/42	.31
<i>SLC35F5</i>	54%	37/20	.98	24/14	.2	13/6	.44	10/6	.64
<i>MSH3</i>	54%	154/83	.7	109/57	.4	45/26	.14	36/21	.32
<i>BAX</i>	44%	154/67	.42	108/45	.27	46/22	.68	34/14	.36
<i>GRK4</i>	41%	163/67	.51	113/43	.74	50/24	.24	41/17	.24
<i>RAD50</i>	39%	185/72	.34	132/52	.61	53/20	.38	43/13	.78
<i>ATR</i>	38%	163/62	.25	113/42	.52	50/20	.34	38/14	.71
<i>MBD4</i>	38%	157/59	.17	112/45	.4	45/14	.076	35/13	.08
<i>GRB14</i>	37%	165/61	.53	116/43	.45	49/18	.75	40/15	.66
<i>HSP110</i>	23% ^a	329/76 ^a	.26	229/54 ^a	.59	100/22 ^a	.02	77/18 ^a	.04
<i>MSH6</i>	23%	174/40	.47	120/31	.87	54/9	.78	40/9	.078
<i>BLM</i>	21%	182/39	.58	127/26	.36	55/13	.99	43/9	.46
<i>CDX2</i>	18%	123/27	.29	110/20	.35	40/7	.6	34/4	.18
<i>RECQL</i>	13%	164/21	.64	119/16	.41	45/5	.16	37/7	.21
<i>RIZ</i>	4%	161/6	.014	117/2	.00092	44/4	.79	37/3	.89
<i>TFDP2</i>	2%	161/3	.57	116/1	.75	45/2	.55	34/1	.55

n, total number of tumor samples analyzed in each case; n.mut, number of mutated samples.

^aMutated samples are those displaying large deletions in the *HSP110* T17 (≥ 5 bp).

calculate the *HSP110*DE9/*HSP110*wt ratio in a small series of primary tumor samples. This RNA ratio suggested that *HSP110*DE9/*HSP110*wt expression might be discriminant for the response of MSI CRC patients to chemotherapy.

In the present work, we further showed the dominant-negative effect of this dominant-negative mutant. We have characterized the 1:1 molecular interaction between *HSP110*wt and *HSP110*DE9 that suggests the *HSP110*DE9/*HSP110*wt ratio in tumor cells must be greater than 1 to neutralize all *HSP110*wt and thereby to obtain a significant chemosensitization. In both cell lines and primary tumors, we have shown this situation occurs in a fraction of MSI samples owing to large deletions of the *HSP110* T₁₇ repeat that allows both the aberrant expression of *HSP110*DE9 mutant and the complete silencing of *HSP110*wt in tumor cells. Our data clearly show that *HSP110* T₁₇ mutations are usually biallelic in primary MSI CRCs. Careful examination of T₁₇ status in a consecutive, multicentered series of patients whose positive MSI status was identified prospectively at the time of diagnosis confirmed that, in line with our molecular data, only patients with large T₁₇ deletions (5 bp or more) and representing a minority but nevertheless important fraction of MSI CRC patients (ie, about 25%) appeared to benefit from 5-FU-based adjuvant chemotherapy. Of particular interest, the association between survival and T₁₇ deletion status remained significant in the subgroup of patients treated with 5-fluorouracil alone.

It has yet to be established that adjuvant chemotherapy confers a clear survival advantage to stage II CRC patients. However, the publication by Andre et al¹⁹ proposed that a group of patients with at risk stage II colorectal cancer may benefit from adjuvant chemotherapy (eg, those with perforation, pT4N0 with vascular emboli, and/or obstructive colorectal cancer). The very good survival rate after

chemotherapy observed for MSI CRC patients with large *HSP110* T17 deletions highlights the potential clinical importance of this predictive biomarker with respect to the use of adjuvant therapy for stage II CRC patients displaying large T17 deletions. It is worth noting that none of the 4 chemotherapy-treated stage II MSI patients with large *HSP110* T17 deletions suffered a relapse. However, it is not possible to reach any firm conclusions given the very small number of stage II patients analyzed who received chemotherapy. An interesting clinical follow-up evaluation therefore would be to confirm independently if stage II MSI patients with large *HSP110* deletions derive any survival benefit from adjuvant chemotherapy.

There were several limitations to this study. Given the number of subjects with the large *HSP110* deletion (ie, about 25% of MSI CRC patients), the clinical relevance of our findings has to be examined further. Importantly, however, it is supported strongly by mechanistic data. In addition, we show that 15 other mutated genes, including some that might play a role in drug response (eg, *ATR*, *ATM*), have no prognostic significance, highlighting the particular role of *HSP110* in predicting response to chemotherapy. We did not assess whether the prognostic impact of *HSP110* T₁₇ deletion was independent of other molecular features such as *BRAF* mutation and the CpG Island Methylator phenotype that have been associated putatively with CRC prognosis and are associated significantly with the MSI phenotype.^{25,26} Finally, the screening for *HSP110* T₁₇ deletions was performed retrospectively and individuals were not randomized to receive chemotherapy, thus potentially introducing some bias. Nevertheless, our MSI tumor cohort is one of the largest ever investigated for survival and was consecutive and collected prospectively. This should minimize the biases often inherent in studies that investigate nonconsecutive

cohorts compiled in a retrospective manner. We observed no associations between *HSP110* mutation status and clinical variables such as disease stage or Lynch syndrome that recently were suggested to influence the survival of MSI CRC patients.²⁷ Moreover, there was no evidence to suggest that the level of instability in mononucleotide repeats such as T₁₇ in *HSP110* differed between Lynch and sporadic MSI tumors.²⁸ Interestingly, a recent immunohistochemistry-based study of a small tumor cohort largely confirmed our findings,²⁹ highlighting that expression of HSP110wt is likely to constitute a prognostic factor in MSI CRC. Despite observing an inverse correlation between HSP110wt expression and the size of *HSP110* T₁₇ deletions in their tumor series, these workers failed to observe a significant impact of T₁₇ mutation status on patient survival. This could be owing to several reasons, including the manner in which somatic T₁₇ deletions were assessed in tumors. As we have shown here, the analysis must be standardized so that it takes into account the polymorphisms within this DNA marker and the heterogeneity of tumor cell content. Other reasons could be the relatively small size of the study cohort and the design of survival analyses.

Although defective MMR is the well-established mechanism by which MSI tumors develop, the precise downstream events that functionally explain differences in the clinical behavior of MSI cancers remain unclear. Confirmation of the present findings using our genomic approach or alternative standardized methods should lead to reconsideration of the clinical behavior of MSI CRCs in terms of response to 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy toward a more individualized medicine.

Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at www.gastrojournal.org, and at <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.054>.

References

1. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260:812–816.
2. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558–561.
3. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027–1038.
4. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247–257.
5. Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, et al. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004; 126:394–401.
6. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3219–3226.
7. Dorard C, de Thonel A, Collura A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 2011;17:1283–1289.
8. Kai M, Nakatsura T, Egami H, et al. Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol Rep* 2003;10:1777–1782.
9. Slaby O, Sobkova K, Svoboda M, et al. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncol Rep* 2009;21:1235–1241.
10. Rerole AL, Gobbo J, De Thonel A, et al. Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anti-cancer chemotherapy. *Cancer Res* 2011;71:484–495.
11. Schuermann JP, Jiang J, Cuellar J, et al. Structure of the Hsp110:Hsc70 nucleotide exchange machine. *Mol Cell* 2008;31:232–243.
12. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 1993; 234:779–815.
13. Biard DS, Despras E, Sarasin A, et al. Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res* 2005;3:519–529.
14. Suraweera N, Duval A, Reperant M, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002;123:1804–1811.
15. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* 2006;24:241–251.
16. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005;352:1851–1860.
17. Svrcek M, Buhard O, Colas C, et al. Methylation tolerance due to an O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Gut* 2010;59:1516–1526.
18. Svrcek M, El-Bchiri J, Chalastanis A, et al. Specific clinical and biological features characterize inflammatory bowel disease associated colorectal cancers showing microsatellite instability. *J Clin Oncol* 2007;25:4231–4238.
19. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2343–2351.
20. Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, et al. Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol* 1999;52:243–251.
21. El-Bchiri J, Guilloux A, Dartigues P, et al. Nonsense-mediated mRNA decay impacts MSI-driven carcinogenesis and anti-tumor immunity in colorectal cancers. *PLoS One* 2008;3:e2583.
22. Ionov Y, Nowak N, Perucho M, et al. Manipulation of nonsense mediated decay identifies gene mutations in colon cancer cells with microsatellite instability. *Oncogene* 2004;23:639–645.

23. Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W, et al. Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:829–835.
24. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995;268:1336–1338.
25. Colas C, Coulet F, Svrcek M, et al. Lynch or not Lynch? Is that always a question? *Adv Cancer Res* 2012;113: 121–166.
26. Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin Cancer Res* 2012;18:6531–6541.
27. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:863–875.
28. You JF, Buhard O, Ligtenberg MJ, et al. Tumours with loss of MSH6 expression are MSI-H when screened with a pentaplex of five mononucleotide repeats. *Br J Cancer* 2010;103:1840–1845.
29. Kim JH, Kim KJ, Rhee YY, et al. Expression status of wild-type HSP110 correlates with HSP110 T deletion size

and patient prognosis in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Mod Pathol* 2013. Epub ahead of print.

Received March 22, 2013. Accepted October 21, 2013.

Reprint requests

Address requests for reprints to: Alex Duval, MD, PhD, INSERM UMRS 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe "Instabilité des Microsatellites et Cancers," Equipe Labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, 34, Rue Crozatier, 75012 Paris, France. e-mail: alex.duval@inserm.fr; fax: 0033143431065.

Acknowledgments

The authors thank Dr Nizar El-Murr for critical reading of the manuscript. The authors posthumously thank to Pr Françoise Piard for her help and contribution to this work.

Conflicts of interest

The authors disclose no conflicts.

Funding

This work was supported by the Carte d'Identité des Tumeurs program (available: <http://cit.ligue-cancer.net>) from the Ligue Nationale Contre le Cancer and by grants from the Institut National du Cancer (A.D.), AD group has the label de « La Ligue Contre le Cancer », an Institut National du Cancer fellowship (A.C.), and a Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche fellowship (A.L.). No funding bodies had any role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ARTICLE 3

**Mutation of HSP110 inhibits tumour growth through a
STAT3/NMD Druggable Pathway in Colorectal Cancer.**

(En soumission)

Mutation of *HSP110* Inhibits Tumour Growth Through a STAT3/NMD Druggable Pathway in Colorectal Cancer

Anaïs Lagrange ^{1,2}, Kevin Berthenet ^{3,4}, Magali Svrcek ^{1,2,5}, Laetitia Marisa ^{1,2,6}, Olivier Buhard ^{1,2}, A'dem M. Bokhari ^{1,2}, Sylvie Dumont ^{1,2,5}, Anastasia R. Goloudina ^{3,4}, Jieshuang Jia ⁷, Guillaume Marcion ^{3,4}, Kristell Wanherdrick ^{1,2}, Eric Adriaenssens ⁷, Sébastien Causse ^{3,4}, Mouna Souissi ^{1,2}, Renaud Seigneuric ^{3,4}, Denis S. Biard ⁸, Thierry Chassat ⁷, Aurélie de Thonel ^{3,4}, Jean-François Flejou ^{1,2,5}, Gaetan Jeco ^{3,4}, Fabrice Lejeune ^{7*}, Carmen Garrido ^{3,4,9*}, Ada Collura ^{1,2*}, Alex Duval ^{1,2*} §

- (1) INSERM, UMRS 938 - Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe "Instabilité des Microsatellites et Cancers", Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, F-75012, Paris, France;
- (2) Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France;
- (3) INSERM, UMR 866, « Equipe labellisée Ligue contre le Cancer » and Laboratoire d'Excellence LipSTIC, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France;
- (4) University of Burgundy, Esplanade Erasme, 21078 Dijon, France;
- (5) AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France;
- (6) Programme "Cartes d'Identité des Tumeurs", Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France;
- (7) Institut de biologie de Lille - UMR CNRS 8161, Equipe Signal, CS 50447, 59019 Lille, France ;
- (8) Centre d'Etude Atomique, Direction des Sciences du Vivant, Institut des Maladies Emergentes et des Thérapies Innovantes, Service d'Etude des Prions et des Infections Atypiques, Fontenay-aux-Roses, France.
- (9) Anticancer Centre Georges François Leclerc, CGFL, Dijon, France

* These authors co-directed this work and contributed equally to this work

§ Address for Correspondence : Alex Duval
INSERM UMRS 938
Equipe "Instabilité des Microsatellites et Cancer"
Hôpital Saint-Antoine
184, rue du Faubourg Saint-Antoine, F75571 Paris cedex
12
Email: alex.duval@inserm.fr

ABSTRACT

Genomic instability is a driving force for oncogenesis. In colorectal cancers displaying microsatellite instability, this leads to the generation of frameshift insertion and deletion mutations within coding DNA repeats, thereby inactivating tumour suppressor genes. Here we demonstrate that deletions in a non-coding intronic DNA repeat of *HSP110* inactivate this chaperone, resulting in strong anti-cancer effects by inhibiting cell proliferation and tumour growth in a xenograft mouse model *via* down-regulation of STAT3 signalling. These anti-cancer effects are enhanced by treatment with a drug used in the clinic to inhibit nonsense-mediated mRNA decay, a process that as shown here degrades the HSP110 dominant negative mutant. Our results highlight HSP110 as an oncogene inactivated by microsatellite instability in tumours, thus challenging the oncogenic role of this process in colon cancer. Nonsense-mediated mRNA decay is a druggable system whose inhibition represents a novel approach for the specific treatment of colon tumours with microsatellite instability.

INTRODUCTION

A subset of colorectal cancers (CRC) exhibit a so-called mutator phenotype that is characterized by widespread instability of DNA repeat sequences (*i.e.* microsatellite instability, MSI) due to mismatch repair (MMR) deficiency¹⁻³. Over the past twenty years, many studies on CRC with MSI have reported truncating mutations in small coding DNA repeats located within tumour suppressor genes involved in various cancer-related pathways (for review, see^{4,5}). In addition to the instability it causes in coding repeats, MSI also frequently affects long non-coding repeats (LNCRs) in tumour DNA. Although LNCRs are almost always altered in MSI tumour cells, only a few are endowed with biological activity and consequently this area has received very little attention. Some are used routinely as diagnostic biomarkers to identify the MSI tumour phenotype in CRC^{6,7}.

An example of where LNCRs are functionally relevant is during pre-mRNA splicing, particularly when the microsatellite sequence is located near the splice acceptor site⁸. Our group recently reported somatic deletions within a T17 intronic microsatellite at the junction between intron 8 and exon 9 of the *HSP110* chaperone gene in human tumours⁹. Using quantitative RTPCR, we observed that a decrease in the length of the *HSP110* T17 DNA repeat correlated with an increased HSP110DE9/HSP110 mRNA ratio. HSP110DE9 represents aberrant mRNA resulting from exon 9 skipping and encodes a truncated, dominant negative isoform of the HSP110 protein. This LNCR mutation was almost always observed in CRC with MSI. It was shown to have a deleterious effect on HSP110 with regards to chemotherapy resistance *in vitro*, causing MSI tumour cells to become sensitized to several chemotherapeutic agents. Moreover, a multicentre cohort of MSI CRC displaying large bi-allelic deletions of the T17 intron repeat (≥ 5 bp) and leading to complete silencing of wild type HSP110 showed excellent response to 5-fluorouracil-based chemotherapy compared to MSI CRC with small deletions (≤ 4 bp)¹⁰.

An important question still to be addressed is whether *HSP110* mutation also has a pathophysiological role during CRC development. This is especially relevant given increasing evidence for the role of heat shock proteins in colon cancer and the recently reported physiological role of HSP110 in colonic mucosa¹¹. However, also to be considered in the

context of MSI tumours is the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) system responsible for rapid degradation of mutant mRNAs containing a premature termination codon (PTC)¹². NMD is mediated through the assembly of protein complexes that include members of the UPF family. UPF1 plays a central role in NMD and is found in all NMD reactions, unlike other members of the UPF family such as UPF2, UPF3 (also called UPF3a) or UPF3X (also called UPF3b)^{13,14}. NMD may have beneficial or detrimental effects on pathophysiological mechanisms depending on the type of mutation and on the nature of the disease itself. This 'Jekyll and Hyde' nature of NMD has been well documented by several studies that examined its effects on the expression of genes affected by germline mutations and responsible for inherited diseases including cancer¹⁵. In contrast, little is known about the functional role of NMD in relation to the somatic mutation events found in malignancy^{16,17}.

In the present work we show that mutation of the *HSP110* T17 intronic DNA repeat leads to strong inhibition of cell proliferation and tumour growth via down regulation of the recently reported HSP110/STAT3 pathway in colon cancer cells^{11,18,19}. In MSI cancer cells, the anti-tumour effects of the dominant negative HSP110DE9 mutant are attenuated due to degradation by NMD. Using nude mice xenografts we show that inhibition of NMD with amlexanox, an approved drug for the treatment of aphthous ulcers and asthma, represents a novel strategy for specific treatment of human MSI CRC²⁰. Our results highlight the oncogenic role of the HSP110 chaperone in colon cancer. They also show how MSI-driven events can have paradoxical anti-cancer effects by inactivating the oncogenic functions of HSP110 in tumour cells. Finally, our results demonstrate the crucial role of NMD in protecting tumour cells in certain contexts and suggest the possibility of personalized treatment for MSI colon cancer patients using an approved NMD inhibitor.

RESULTS

Expression of HSP110DE9 mutant mRNA is censored by Nonsense-mediated mRNA decay in MSI CRC cells and primary tumours

We carefully analysed the expression of *HSP110* wild type and *HSP110DE9* mutant mRNA in CRC cell lines and primary tumours using quantitative RTPCR. Schematic representation of both transcripts is shown in **Fig. 1A**. Although MSI-induced deletions in the *HSP110* T17

repeat led to decreased expression of wild type *HSP110* mRNA, we did not detect a concomitant increase of the *HSP110DE9* transcript in CRC cell lines (**Fig. 1B**, left panel and Supplementary **Fig. S1**). Similarly, HCT116 sub-clones with MSI and displaying large or small deletions in *HSP110* T17 (**Fig. 1B**, right panel) showed positive or absent expression of *HSP110* wild type protein, respectively, as previously reported ¹⁰). Similar results were obtained in primary colon tumours, where *HSP110DE9* mRNA expression was not elevated in MSI CRCs compared to MSS CRCs (**Fig. 1C**) and to paired normal mucosa samples (**Fig. 1D**, lower panel). We confirmed in a large series of primary colon tumours, adenomas and paired normal mucosa that when all *HSP110* mRNAs were quantified using micro-arrays and regardless of the presence or absence of exon 9 sequence: (i) *HSP110* transcripts were overexpressed in both primary CRCs and adenomas compared to normal mucosa samples, (ii) *HSP110* was expressed at higher levels in MSS compared to MSI primary tumours, and (iii) within MSI tumours, an inverse correlation was observed between the expression of *HSP110* transcripts and the size of T17 somatic deletions (**Fig. 1D**, upper panel and Supplementary **Fig. S2**).

We next investigated whether *HSP110DE9* mRNA was targeted by NMD in MSI tumour cells. Similar to other PTC-containing transcripts (*e.g.* *TGFBR2*, *MSH3*), treatment with the translation inhibitor cycloheximide (CHX) increased the expression of *HSP110DE9* mRNA in MSI CRC cell lines with small (≤ 4 bp; HCT116, HCT8) or large (≥ 5 bp; LS174T, RKO) T17 deletions compared to MSS CRC cell lines with no deletions (FET, SW480) (**Fig. 1E**, left panel). Accumulation of aberrant *HSP110DE9* mRNA following CHX treatment was higher in MSI HCT116 sub-clones with large bi-allelic T17 deletions compared to those with small deletions (**Fig. 1E**, right panel). Inhibition of *HSP110DE9* mRNA expression by NMD was further demonstrated by using SiRNA and ShRNA targeted to the major NMD factor UPF1 in the same CRC cell line (HCT116). UPF1 depletion led to significant re-expression of *HSP110DE9* and other mutated PTC-containing transcripts (*TGFBR2*, *MSH3*), in contrast to wild type mRNA controls (**Fig. 1F** and Supplementary **Fig. S1C**). Of interest, the endogenous expression of UPF1 (**Fig. 1G**, left panel) and other NMD factors (**Fig. 1G**, right panel) were higher in MSI compared to MSS primary CRC, indicating the importance of this system in degrading the many PTC-containing mRNAs generated by MSI.

Decreased HSP110 activity in MSI CRC cells is responsible for the strong inhibition of cell proliferation and tumour growth and involves STAT3

In addition to its previously reported effect on the sensitization of tumour cells to chemotherapy, we investigated whether *HSP110* mutation also has a pathophysiological role in MSI tumourigenesis. We observed inhibition of cell proliferation in HCT116 sub-clones that correlated with the size of deletions in the *HSP110* T17 LNCr (**Fig. 2A**). In line with these observations, a marked decrease in tumour growth was observed in xenografts derived from HCT116 sub-clones with large vs small T17 deletion (**Fig. 2B**). Similarly, overexpression of wild type HSP110 in SW480 (MSS) or HCT116 (MSI) cells led to an increase in the overall number of cells and in the number of cells in S-phase (**Fig. 2C**, left panel). In contrast, overexpression of the HSP110 inhibitor HSP110DE9 under the same conditions caused a slight decrease in the percentage of S-phase cells (**Fig. 2C**, right panel). Finally, stable overexpression of HSP110DE9 led to significantly decreased tumour growth in xenografted nude mice in the HCT116 MSI colorectal tumour model compared to HSP110wt or empty vector (**Fig. 2D**, lower left panel). Similar results were obtained in MSS colorectal (SW480) and MSS gastric (TKM1) tumour xenograft models, demonstrating the anti-cancer impact of HSP110DE9 following the forced overexpression of this mutant protein in both MSI and MSS gastrointestinal tumour models (**Fig. 2D**, lower right panel).

We next investigated whether these observations were related to the modulation of STAT3 activity by HSP110 in stressed cells *in vitro*, as reported recently by Olszak et al ¹¹. HSP110 expression was confirmed to have a positive impact on STAT3 activity in our CRC models (Supplementary **Fig. S3**). In accordance with the literature, transfection-induced overexpression of HSP110 induced the phosphorylation of STAT3 (Supplementary **Fig. S3A**) and increased the amount of P-STAT3 in the nucleus (Supplementary **Fig. S3B**). Both HSP110 and STAT3 co-localized within the cell (Supplementary **Fig. S3C**) and interacted, as demonstrated by co-immunoprecipitation (Supplementary **Fig. S3D**) and interference biolayer experiments with recombinant purified proteins (Supplementary **Fig. S3E**). An *in vitro* phosphorylation assay demonstrated that HSP110 chaperone facilitated STAT3 phosphorylation by JAK2 (Supplementary **Fig. S3F**) and enhanced the expression of STAT3-downstream genes such as *c-MYC* and *MCL1* (Supplementary **Fig. S3G**). We previously showed the endogenous level of HSP110 expression was dependent on the deletion status

of the T17 intronic LNCr in tumour DNA (Supplementary **Fig. S2**). To investigate whether the phosphorylation level of STAT3 showed a similar pattern, we used as models two HCT116 sub-clones displaying either small or large T17 deletions. The level of phosphorylated STAT3 was significantly higher in the sub-clone with a small T17 deletion (**Fig. 3A**). In both SW480 (MSS) and HCT116 (MSI) cells, the HSP110DE9 mutant inhibited STAT3 phosphorylation induced by HSP110 in a dose-dependent manner (**Fig. 3B**). Consequently, HSP110DE9 also blocked the expression of genes downstream of STAT3 such as *c-MYC*, *MCL1*, *CCND1* and *BCL-XL* (**Fig. 3C**). Similar to HSP110DE9, the STAT3 inhibitor AG490 provoked a dose-dependent reduction in the accumulation of S-phase cells induced by HSP110 and in the ability of HSP110 to induce STAT3 downstream genes such as *c-MYC* and *CCND1* (**Fig. 3D**). It is worth noting that AG490 did not induce apoptosis at the concentrations used. The main pathway for STAT3 activation is thought to be IL-6. ELISA assays showed that HSP110 did not affect the secretion of IL-6 (data not shown). However, HSP110 favoured STAT3 phosphorylation induced by increasing doses of IL-6 (**Fig. 3E** and **S3H**). This effect was blocked by the presence of HSP110DE9. Finally, intestinal organoids (crypts) from HSP110wt and HSP110KO animals were used to demonstrate that IL-6 could induce STAT3 phosphorylation in *ex vivo* cultured organoids from wild type animals, whereas almost no phosphorylation was detected in those from HSP110KO animals (**Fig. 3F**).

Modulation of STAT3 activity is dependent on the mutation status of HSP110 T17 in MSI tumour xenografts and primary colon cancers

P-STAT3 expression in colon tumour xenograft models was correlated to their *HSP110* T17 deletion status. We xenografted HCT116 sub-clones displaying small or large *HSP110* T17 deletions and subsequently determined STAT3 phosphorylation in the tumours. As expected, the P-STAT3 level was much higher in tumours derived from the sub-clone with a small deletion (**Fig. 4A**).

We also assessed P-STAT3 expression in primary MSI CRCs displaying small or large deletions in the *HSP110* T17 LNCr. This confirmed the significant association between HSP110 expression and T17 deletion status ($P < 0.05$; **Fig. 4B**). Primary MSI colon tumours with large T17 deletions showed significantly less P-STAT3 expression ($P < 0.05$; see Materials and Methods and **Fig. 4B** legend for further details).

Therapeutic inhibition of NMD in colon cancer cells

Given that NMD was earlier shown to censor the expression of HSP110DE9 mutant and other PTC-containing mRNAs in MSI CRC cells (**Fig. 1F-G**), we further investigated the functional consequences of NMD inhibition in these cells. Prolonged inhibition of UPF1 or UPF2 expression in HCT116 cells using ShRNA led to decreased cell proliferation (**Fig. 5A**). It also led to a significant decrease in the size of tumour xenografts derived from ShUPF1- or ShUPF2-transfected HCT116 cells compared to controls transfected with scrambled ShRNA (**Fig. 5B**).

We next investigated the effects of amlexanox, an inhibitor of NMD. This agent caused significant re-expression of several mRNAs containing PTCs (results not shown), including HSP110DE9 (**Fig. 5C**), in MSI HCT116 cells but not in MSS SW480 cells. Interestingly, amlexanox also inhibited NMD in a dystrophin transgenic mouse model. Our results showed the presence of a significant amount of dystrophin PTC-mRNA in mice exposed to amlexanox compared to mice exposed to DMSO, demonstrating this agent is capable of inhibiting NMD *in vivo* (**Fig. 5D**). We then used amlexanox in nude mice xenografted with MSI (HCT116) or MSS (SW480) tumour cells displaying mutant and wild type *HSP110* T17 repeat, respectively. Treatment with this agent led to significant inhibition of tumour growth in mice xenografted with HCT116 cells compared to untreated animals receiving mock buffer (**Fig. 5E**, left panel). In contrast, amlexanox had no effect on the growth of SW480 xenografts under the same experimental conditions (**Fig. 5E**, right panel).

DISCUSSION

HSP110 is the first chaperone protein found to be mutated in cancer thus far. In our earlier work we demonstrated a pro-apoptotic, dominant negative function for the mutant protein HSP110DE9 when overexpressed in colon cancer cells⁹. Our data also indicated the *HSP110* T17 mutation in MSI primary CRC was a predictive factor for good patient response to chemotherapy¹⁰. Other studies have linked HSP110 expression with metastasis and poor prognosis in primary CRC²¹ and with response to treatment in MSI colon tumours²².

However, we failed to detect any pathophysiological consequences that could be related to the aberrant expression of HSP110DE9 in MSI CRC. In the present work we show that HSP110DE9 does not impact on MSI tumourigenesis because its PTC-containing mRNA is degraded by NMD within the tumour cell. Consequently, the inhibition of HSP110 activity following somatic deletion of the T17 LNCr is due to the loss of wild type HSP110 expression. The following pathophysiological model can be advanced (see also **Fig. 6A** for a schematic representation): MSI CRC cells initially display small bi-allelic T17 deletions that are compatible with lower but nevertheless positive expression levels of wild type HSP110 protein. At this step, wild type HSP110 expression is significantly lower in MSI CRC than in MSS CRC, but the functional consequences, if any, are unknown. As the MMR-deficient tumour cells continue to proliferate, unrepaired replication errors accumulate and hence the T17 deletions become longer, reaching 4 or more base pairs in 30% of MSI CRC ¹⁰. At this point wild type HSP110 protein is no longer produced and as reported here the tumour acquires a low proliferation rate because P-STAT3 activity is down-regulated, probably in conjunction with other unknown mechanisms. Overall, these findings highlight an unexpected and paradoxical new characteristic of the MSI-driven pathway in colon cancer. MSI can negatively impact colon tumour development by reducing the activity of HSP110, demonstrated here to be clearly oncogenic. This might explain some important clinical characteristics of MSI CRC, such as their initial high propensity to arise and proliferate locally, but with subsequently low invasive and metastatic ability. Further investigations including functional analysis of *HSP110* mutations in an MMR-deficient mouse model are required to further test this hypothesis.

It is unlikely the anti-oncogenic mutation event leading to inactivation of HSP110 would be randomly selected in MSI colon carcinoma. Instead, we believe the very high frequency of *HSP110* mutation in these cancers is due to the large size of the intronic *HSP110* DNA repeat (17T), given that our earlier work showed LNCr are hot spots for insertion and deletion mutations in MMR-deficient tumours ⁶. Active degradation of HSP110D9 transcripts by NMD was shown here to protect tumour cells from the deleterious impact of this dominant negative mutant (see also **Fig. 6A** for further details). Inhibition of NMD activity in MSI cancers appeared to be functionally relevant and mimicked the impact of HSP110DE9 overexpression in both cultured cells and tumour xenografts by adversely affecting cell

proliferation and tumour growth. These effects were not observed in an MSS CRC cell line (SW480) in the same experimental conditions, indicating specificity for MSI cancer. One can speculate that numerous other MSI-driven mutant PTC-mRNAs are processed by NMD in MSI colon tumours, as previously suggested^{16,17,23}. Nevertheless, these mutations affect coding DNA repeats and result in loss of function effects due to inactivation of tumour suppressor genes (*e.g. TGFBR2, BAX, IGF2R, MSH3, MSH6, RAD50*). Although these mutant PTC-mRNAs are processed by NMD, no resultant pathophysiological impacts are expected since, in contrast to the HSP110DE9 mutant, the corresponding mutant proteins do not have residual biological activity^{16,17,23}.

As shown here and in other recent publications^{11,18,19}, the oncogenic role of HSP110 in colon cancer might be partly explained by its ability to phosphorylate STAT3, thereby promoting cancer cell proliferation. Inhibition of HSP110 may therefore be an important factor in cancer therapy. Unfortunately, no inhibitors of HSP110 are currently available and the dominant negative HSP110DE9 truncated protein is too big and with important drawbacks to be used in the clinical setting. The current work has established proof of concept for an attractive way to decrease HSP110 levels in MSI tumours by increasing the expression of HSP110DE9 mutant protein via the use of NMD inhibitors such as amlexanox²⁰. This drug is already in clinical use for the treatment of recurrent aphthous stomatitis²⁴. It is also worth noting that amlexanox was recently reported to inhibit the protein kinases TBK1 and IKK- ϵ in mice²⁵. It may therefore have had effects other than the inhibition of NMD in the present study. Nevertheless, amlexanox was shown here to efficiently inhibit NMD in the mouse. Furthermore, this drug caused significant and specific inhibition of MSI tumour growth in mice, while lacking any evident toxicity in mouse models and in patients treated for aphthous ulcers (see²⁶). Thus, amlexanox offers a potentially new form of personalized therapy for patients with MSI cancer.

In conclusion, this study found an unexpected and paradoxical anti-cancer effect of the MSI-driven pathway involving mutation of a LNCR that inactivates the oncogenic chaperone *HSP110*. This work also highlights the role of NMD as an oncogenic process in MSI tumours, as outlined in **Fig. 6B**. The NMD inhibitor amlexanox warrants testing in clinical trials as a novel anti-cancer agent for the personalized treatment of MSI cancer patients.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: HSP110DE9 expression is censored due to Nonsense-mediated mRNA decay in MSI CRC cells and primary tumours. (A) Schematic representation of HSP110 wild type and HSP110DE9 mutant mRNA. Expected expression level of each mRNA according to our previous results. PTC: Premature Termination Codon. **(B)** Relative mRNA expression levels of HSP110wt and HSP110DE9 determined by quantitative RT-PCR in MSS and MSI CRC cell lines (left panel: No T17 deletion [No Del], n=6; Small T17 Deletion [Del^S], n=4; Large T17 Deletion [Del^L], n=6) or in HCT116 sub-clones (right panel: Del^S, n=2; Del^L, n=2). **(C)** Relative expression levels of HSP110wt and HSP110DE9 mRNAs determined by quantitative RT-PCR in MSS and MSI CRC primary tumours (No Del, n=36; Del^S, n=28; Del^L, n=7). **(D)** Quantification of all *HSP110* mRNAs regardless of the presence or absence of exon 9 using micro-arrays (upper panel: normal colonic mucosa [Muc], n=95; adenoma [Ade], n=32; MSS colon carcinoma [MSS], n=48; MSI colon carcinoma [MSI], n=40). See also Supplementary Figure S2C for further details concerning the *HSP110* probes spotted on the array. Relative expression levels of *HSP110DE9* mRNA determined by quantitative RT-PCR in primary tumours and paired normal colonic mucosa (lower panel: [Muc-MSS], n=6; [Muc-MSI], n=11). **(E)** Relative expression levels of HSP110wt, *HSP110DE9*, *TGFBR2*, or *MSH3* mRNAs determined by quantitative RT-PCR in CRC cell lines (left panel) or in HCT116 sub-clones (right panel: Del^S, n=2; Del^L, n=2) after cycloheximide [CHX] treatment (4h, 400 μ g/ml). CRC cell lines analysed with HSP110wt and HSP110DE9 probes, [No Del] = SW480 and FET; [Del^S] = HCT116 and HCT8; [Del^L] = RKO and LS174T). CRC cell lines analysed with *TGFBR2* probe, [No Del] = SW480 and FET; Heterozygote [Htz], HCT8 and RKO; Homozygote [Hmz] = HCT116 and LS174T. CRC cell lines analysed with *MSH3* probe, [No Del] = SW480 and HCT8; Heterozygote [Htz], LS174T; Homozygote [Hmz] = HCT116. **(F)** Relative mRNA expression levels of candidate target genes for MSI determined by quantitative RT-PCR in HCT116 CRC cells transfected with shRNA-UPF1. **(G)** Microarray analysis of UPF1 expression (left panel: [Muc], n=95; [Ade], n=32; [MSS], n=48; [MSI], n=40) and other NMD-related factors (right panel). For all panels, * p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001; [ns]: non-significant; except panel G: **p < 0.001, ***p < 0.0001.

Figure 2: Decrease in HSP110 activity is responsible for marked inhibition of cell proliferation and tumour growth. (A) Proliferation assay for HCT116 sub-clones during 4 day culture (Small T17 Deletion: C1 and C2; Large T17 Deletion: C19 and C22). (B) Comparative analysis of tumour growth (mean tumour volumes) in xenografts derived from HCT116 sub-clones. (C) The number of SW480 cells and percentage of cells in the S phase after BrdU incorporation and 7-AAD staining were determined 48h after transfection with plasmids coding for control-GFP, HSP110-GFP or HSP110ΔE9-GFP. (D) Schematic representation of the xenograft protocol (upper panel). Comparative analysis of tumour growth (mean tumour volumes) in xenografts derived from tumour cells stably transfected with vectors expressing HSP110wt or HSP110DE9 protein. Experiments were performed with MSI CRC cells (HCT116 cell line), MSS CRC cells (SW480 cell line) and MSS gastric cancer cells (TMK1 cell line). Ten mice per group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Figure 3: HSP110 effect on tumour growth involves STAT3 activation. (A) Immunoblot analysis of P-STAT3, STAT3 and HSP110 in two HCT116 sub-clones with either small (C2) or large (C22) deletions in the *HSP110* T17 repeat. Actin, loading control. (B) Immunoblot analysis of P-STAT3, HSP110 and HSP110ΔE9 in SW480 (left panel) and HCT116 (right panel) cells, 48h after transfection with plasmids coding for HSP110-GFP and increasing concentrations of HSP110ΔE9-GFP. HSC70 serves as a loading control. (C) Immunoblot analysis of cyclin D1, c-Myc, Mcl1, Bcl-xL and P-STAT3 in SW480 cells, 48h after transfection by plasmids coding for control-GFP, HSP110-GFP or HSP110ΔE9-GFP. HSC70 serves as a loading control. (D) Upper panel, percentage of GFP positive SW480 cells in the S phase assessed by BrdU incorporation and 7-AAD staining, 48h after transfection with plasmids coding for control-GFP or HSP110-GFP and treated during the last 24h with or without increasing doses of AG490 (40, 80, 120μM). Lower panel, immunoblot analysis of c-Myc and cyclin D1 in one representative experiment performed as above. Actin, loading control. (E) Immunoblot analysis of P-STAT3 and STAT3 in SW480 cells 48h after transfection with plasmids coding for control-GFP, HSP110-GFP or HSP110ΔE9-GFP and treated during 30 minutes with or without IL-6 (10 or 100ng.mL⁻¹). (F) Immunoblot analysis of P-STAT3 in mouse colon crypt biopsies isolated from wild type or HSP110KO mice, and treated *ex vivo* during 30 minutes with or without two concentrations of IL-6 (10 or 100ng.mL⁻¹). STAT3

serves here as a loading control. One representative experiment is shown (4 mice per group).

Figure 4: Somatic deletions of the HSP110 T17 intronic DNA repeat lead to down-regulation of STAT3 activity *in vivo*. **(A)** Schematic representation of the protocol (upper panel). Representative images of HCT116 sub-clones (C2 and C22) xenograft sections stained with P-STAT3 antibody by immunohistochemistry (experiments in 5x replicates). P-STAT3 expression is positive in C2 whereas no expression of P-STAT3 was observed in C22. Magnification x100. **(B)** Immunostaining in primary MSI colon tumours. Significant associations were observed for the expression of HSP110 and P-STAT3, and for the expression of HSP110 overall and T17 deletion status in these tumours (upper panel). Representative images of primary colon tumours displaying double positive or double negative immunostaining are shown (x100 magnification). For A and B, the inserts correspond to a detail of the immunostaining (x200 magnification).

Figure 5: Induction of HSP110DE9 overexpression by therapeutic inhibition of NMD in colon cancer cells. **(A)** Proliferation of HCT116 CRC cells stably transfected with shRNA-Control (scrambled), ShUPF1 or ShUPF2. **(B)** Comparative analysis of tumour growth (mean tumour volumes) in nude mice xenografted with HCT116 CRC cells transfected with the same shRNA-Control (scrambled), ShUPF1 or ShUPF2 (ten mice per group). **(C)** SW480 (*HSP110wt* mRNA) or HCT116 (PTC-containing *HSP110DE9* mRNA) cells were incubated with increasing amounts of amlexanox for 24 hours. Histogram representation shows the ratio of the amount of HSP110DE9 mRNA versus GAPDH mRNA determined by quantitative RT-PCR. This ratio was set arbitrarily at 1 in the presence of DMSO. **(D)** MDX mice harbouring a nonsense mutation in exon 23 of the dystrophin gene were injected subcutaneously with 1.2mg of amlexanox/kg for 24 hours. The results for 3 mice injected with DMSO or 3 mice injected with amlexanox are shown. The 3 left lanes represent a serial dilution of RT from an untreated wild-type mouse. $*=p<0.1$. **(E)** Schematic representation of the protocol for treating mice with the NMD inhibitor amlexanox (upper panel). The osmotic pump contained either a mock buffer made with 50% DMSO and 50% PEG400, or amlexanox diluted in the mock buffer in order to deliver 0.15mg of amlexanox per day to each mouse for 28 days. Comparative analysis of tumour growth (mean tumour volumes) in mice treated with or

without amlexanox. Experiments were performed with MSI CRC cells (HCT116 cell line) and MSS CRC cells (SW480 cell line). Eight mice per group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

Figure 6. Proposed scheme for the molecular, pathophysiological and clinical consequences of microsatellite instability in colorectal cancer. (A) Consequences of *HSP110* T17 deletions in colon tumours. In contrast to MSS tumours, all MSI tumours have a deletion in the T17 *HSP110* sequence. Those with small deletions (≤ 4 pb, about 75% of all CRC MSI) still express wild type *HSP110* protein. Consequently, they still have a high proliferation rate and resistance to chemotherapy. In contrast, tumours with large deletions (≥ 5 pb, about 25% of all CRC MSI) do not express wild type *HSP110* anymore and, therefore, they have a low proliferation rate and become sensitive to the chemotherapy. **(B)** The NMD as an oncogenic process in MSI tumours. Numerous MSI-driven mutant PTC-mRNAs processed by NMD have been reported in MSI colon tumours. In contrast to that of *HSP110*, these mutations affect short coding DNA repeats and they are selected in tumour cells when they result in loss of function effects inactivating tumour suppressor genes (e.g. *TGFBR2*, *BAX*, *IGF2R*, *RAD50*, ...). Although these mutant PTC-mRNAs are degraded by NMD, no resultant pathophysiological impact is expected since the corresponding mutant proteins do not have residual biological activity. In sharp contrast, *HSP110DE9* mutant processing by the NMD has biological negative consequences for the tumour. Amlex, NMD inhibitor amlexanox.

Figure S1: *HSP110DE9* and *HSP110WT* expression in MSS, MSI-Small and MSI-Large CRC cells and primary tumours. (A) Amplification plots corresponding to *HSP110wt* and *HSP110DE9* RT-PCR products in MSS, MSI-Small and MSI-Large CRC cell lines, or **(B)** in MSS, MSI-Small or MSI-Large primary tumours. Upper line: results are expressed ($E = 2^{-dCT}$) as n-fold difference in *HSP110DE9* relative to *HSP110wt* expression (dCT), where dCT was determined by subtracting the average CT value of the *HSP110DE9* mRNA from the average CT value of the *HSP110wt* mRNA. Middle line: results are expressed ($E = 2^{-dCT}$) as n-fold difference in *PO* (endogenous control) relative to *HSP110wt* expression (dCT), where dCT was determined by subtracting the average CT value of the *HSP110WT* mRNA from the average CT value of the *PO* mRNA. Bottom line: results are expressed ($E = 2^{-dCT}$) as n-fold difference in *PO* (endogenous control) relative to *HSP110DE9* expression (dCT), where dCT

was determined by subtracting the average CT value of the *HSP110DE9* mRNA from the average CT value of the *PO* mRNA. **(C)** Relative mRNA expression levels determined by quantitative RT-PCR in HCT116 cells transfected with siRNA-UPF1.

Figure S2: HSP110 mRNA expression distribution measured by microarray. **(A)** Densities and bar plots of *HSP110* log2 intensities in normal colonic mucosa (muc), adenomas (ade), MSS tumors (mss) and MSI tumors (msi). **(B)** Boxplot of *HSP110* log2 intensity levels according to *HSP110* T17 deletion size. **(C)** Probe locations of the two Affymetrix probe sets (206976_s_at and 208744_x_at) annotated for *HSP110* mRNA. Boxes represent exons, only the last exons are shown. Probe sets measured both *HSP110* wild type and *HSP110DE9* mutant mRNAs.

Figure S3: HSP110 associates with STAT3 and induces its phosphorylation. **(A)** Immunoblot analysis of P-STAT3, STAT3 and HSP110 in SW480, 48h after transfection with plasmids coding for HSP110 (HA- and GFP-tagged, wells 2,3 and 4,5, respectively). Actin serves as loading control. **(B)** P-STAT3 level was determined by immunoblot in nuclear extracts from SW480 cells transfected with or without GFP-HSP110. Nuclear PARP1 and mitochondrial HSP60 serve as controls for nuclear extract purity. **(C)** Representative microscopy analysis of HSP110 (green) and STAT3 (red) in SW480 cells, 48h after transfection with HSP110-GFP. **(D)** Immunoprecipitation (IP) of STAT3 in SW480 cells was followed by western blot using an anti-STAT3 [IP STAT3] or a non-relevant [IP ct] antibody. **(E)** The interaction between purified HSP110 and STAT3 (1 mM each) was analysed with an OctetRed instrument by biolayer interferometry. The ligand, HSP110, was biotinylated according to the manufacturer's protocol. **(F)** Immunoblot analysis of P-STAT3, STAT3, HSP110 and P-JAK2 after *in vitro* kinase assay performed in the presence of recombinant STAT3 as a substrate (100 ng), with or without ATP (250μM), recombinant JAK2 (25 ng), or both. HSP110-HA produced by TNT RRL was added when indicated. As a control, the TNT RRL product of an empty-HA vector was used. **(G)** qPCR analysis of c-Myc and Mcl1 gene expression in SW480 cells, 48h after transfection with a control-GFP or HSP110-GFP. **(H)** Fluorescence microscopy analysis of GFP and P-STAT3 in SW480 cells, 48h after transfection with HSP110-GFP or HSP110ΔE9-GFP and treated during the last 30 min with IL-6 (100 ng.mL⁻¹).

MATERIALS AND METHODS

Primary colon tumour samples and CRC cell lines. CRC cell lines were purchased from the American Type Culture Collection. HCT116 sub-clones were obtained using MoFlo Astrios (Beckman Coulter, Paris, France), spotting 1 cell/well in 96-well plates containing 200 μ L of Dulbecco's modified Eagle media. All cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle media as described. Primary tumours and normal colonic tissues were obtained from patients undergoing surgery in our hospital (Hôpital Saint-Antoine, Paris, France). MSI status was determined as described previously ⁷.

HSP110 T17 deletion analysis and Real-Time quantitative RT-PCR analysis. DNA was extracted using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen). T17 deletion status was determined as previously described ⁹. Total RNA was extracted with an RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was evaluated on a 2100 Bioanalyser using the RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent) for all primary tumour samples. Only samples with RIN > 5 were used. Complementary DNAs were synthesized using the High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). For quantitative RT-PCR, we used the Applied Biosystems analysis software. Expression values of *HSP110WT* and *HSP110DE9* transcripts were calculated relative to *RPLP0* ubiquitous RNA, and expression values for *TGFBR2*, *MSH3*, *BAX*, *IGF2R* and *GAPDH* were calculated relatively to 18S ubiquitous RNA. Primers and internal probes for *HSP110WT* and *HSP110DE9* were as described earlier ⁹. Primers and internal probes for *TGFBR2*, *MSH3*, *BAX*, *IGF2R*, *GAPDH*, *18S* and *RPLP0* were those proposed by Applied Biosystems (TaqMan gene expression assays). The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95°C for 10 min and 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min.

Cycloheximide treatment. Cells seeded into 6-well culture plates (2×10^5 cells per well) in DMEM media supplemented with 10% FCS containing 10 U.ml⁻¹ penicillin G and 100 μ g.ml⁻¹ streptomycin were treated with Cycloheximide (400 μ g.ml⁻¹, Sigma-Aldrich) for 4h.

Transfection with si-RNA. The HCT116 CRC cell line was seeded into 6-well culture plates (1×10^5 cells per well) and transiently transfected with 50 nM of siRNA directed against UPF1 or with non-specific siRNA (Thermo Fisher) using the Dharmafect reagent (Thermo Fisher) according to manufacturer's instructions. An siRNA directed against GAPDH (Thermo Fisher) was used as a transfection control. Cells were collected for total RNA extraction 48h post-transfection. Each transfection experiment was performed in triplicate.

Transfection with shRNA. The HCT116 CRC cell line was seeded into a 10 cm petri dish (6×10^5 cells per well) in the presence of 10 μ g of shRNA directed against UPF1, UPF2 or non-specific shRNA (Thermo Fisher) using the Dharmafect reagent (Thermo Fisher) according to manufacturer's instructions. An shRNA directed against GAPDH (Thermo Fisher) was used as a transfection control. After 72 hours, the cell medium was supplemented with puromycine (3 μ g/mL). After several days, sub-clones were selected for each shRNA. *In vivo*, 10×10^6 cells of each HCT116 sub-clone transfected with shRNA were injected s.c. into the flank of nude mice (Charles River Laboratories, Wilmington, USA). The tumour size was measured 3 times per week during 42 days.

Cell Proliferation. Proliferation rates were assessed in culture using WST-1 (Roche, Mannheim, Germany). 2×10^4 cells of each HCT116 sub-clone transfected with shRNA were plated per well in 24-well plates in 2mL of media. WST-1 reagent was added and incubated for 4 hours at 37°C at the end of the proliferation test. The absorbance was measured at 450nm and the reference wavelength was 750nm.

Transient cell transfection and treatments. 1.2×10^5 SW480 cells or 2.5×10^5 HCT116 cells were cultured in a 12-well plate for 24h. Cells were then transfected with 1 μ g of plasmid coding for either GFP, GFP-HSP110 or GFP-HSP110DE9 using HP Xtreme gene DNA transfection reagent (Roche, Boulogne-Billancourt, France) according to the manufacturer's instructions. In some experiments, cells were treated by the Janus kinase 2 protein inhibitor AG490 (Millipore, Molsheim, France) 24h after transfection for 24h. To induce STAT3 activation, human cell lines or mouse colon crypts were treated respectively with human (Life technologies, Saint-Aubin, France) or mouse (Miltenyi, Paris, France) IL-6 (10 or 100 ng.mL⁻¹).

Cell cycle analysis. Cell cycle was analysed using the APC-BrdU Flow kit from BD Pharmingen (Franklin Lakes, USA). Briefly, cells were incubated with BrdU (10 μ M, 60 min), then washed in PBS, fixed with BD cytofix/cytoperm solution (15 min, RT) and permeabilized with Cytoperm/Permeabilisation (10 min). After wash and 5 min incubation with BD Cytofix/Cytoperm, cells were incubated for 1 hour at 37°C with DNase (300 μ g.ml⁻¹). Cells were then washed and incubated with APC-labeled anti-BrdU antibody (20 min. RT). 7-AAD was used to stain total DNA and cell cycle analysis was performed using a LSRII flow cytometer Becton Dickinson, Franklin lakes, USA).

Stable cell transfection and xenografts. HCT116, SW480, and TMK1 cell lines were transfected with an Epstein-Barr virus-based vector construction coding either for HSP110wt, HSP110DE9 or an empty vector, as previously described ¹⁰. 10x10⁶ cells of each cell line transfected with plasmid were then injected s.c. into the flank of nude mice (Charles River Laboratories, Wilmington, USA). The tumour size was measured 3 times per week during 29 days (SW480 cell line) or 38 days (HCT116 and TMK1 cell lines).

Immunoblot analysis and immunoprecipitation. Cells were harvested, washed in PBS and then lysed on ice in lysis buffer (150mM NaCl, 50 mM Tris pH 6,8, 10 mM NaF, 1mM DTT, 1% Triton X-100) in the presence of protease (Roche, Boulogne-Billancourt, France) and phosphatase (Sigma-Aldrich, Lyon, France) inhibitors. Proteins were separated and transferred following standard protocols before analysis with a chemiluminescence detection kit (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Primary antibodies used for immunoblotting were from Cell signalling (Danvers, USA) directed against Bcl-xL (2764S), c-Myc (9605S), Cyclin D1 (2926S), P-STAT3 (9145S), STAT3 (9139S), P-JAK2 (3771S), and β -catenin (8480S), from Santa Cruz biotechnologies directed against Mcl-1 (sc-819), HSC70 (sc-7298), HSP110 (sc-6241), GFP (sc-8334), PARP1 (sc-8007), from Sigma for anti-actin (A1978-200UL), and from Enzo Life Sciences for anti-HSP60 (ADI-SPA-828).

For immunoprecipitation, 2.5x10⁶ HCT116 cells were cultured in a 10mL Petri dish during 48h. Cells were then washed in PBS, incubated in 500 μ L of PBS-EDTA 5mM and mechanically lysed by 3 passages through needles from 18G to 26G. Lysates were centrifuged (16000g, 10 min, 4°C) and supernatants collected. 200 μ L of cell lysate was incubated with 2 μ g of control

Lagrange A, et al.

antibody (sc-2027, Santa Cruz Biothenology, USA) or anti-STAT3 antibody (9132S, Cell signaling) wheeling overnight at 4°C. Immunocomplexes were then precipitated with protein A/G-Sepharose (Millipore, Molsheim, France).

Cytoplasmic and nuclear extracts were obtained using the « NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction reagents » kit from Thermo Scientific (Waltham, USA).

Immunofluorescence. Colon cancer cell lines were seeded in lab-tek (Thermo scientific, Waltham, USA). After treatment, supernatants were removed, cells were fixed with 4% PFA (15 min), washed 3 times with PBS and permeabilized in methanol 100% (-20°C for 10 min). After washing with PBS, samples were saturated with PBS (5% BSA, 0.3% Triton X-100) during 1 h and incubated overnight at 4°C with primary antibodies (1/100 dilution in 1% PBS/BSA, 0.3% Triton X-100). After washes, appropriate secondary antibodies coupled with fluorochromes (Alexa 488 or Alexa 568, Life technologies, Saint-Aubin, France) were added during 45 min at room temperature in the dark. The nucleus was labelled by DAPI (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Images were acquired using the Cell Observer station (Zeiss, Germany). This system is composed of an inverted microscope AxioVert 200M equipped for fluorescence with a CCD camera. It is motorized and controlled by Axiovision software (Zeiss).

In vitro kinase assay. HSP110 was produced using the “TNT Quick coupled Transcription/translation systems” kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) as follow: 0,5µg of a plasmid encoding for HSP110-HA was added to the reaction mixture, supplemented with methionine (20µM), and incubated for 90 min at 30°C. Twenty microliters of the *in vitro* translated proteins were added to 400µL of lysis buffer (50mM HEPES, 20% Glycerol, 5mM EDTA, 250mM NaCl, 1% NP40, 1mM NAVO₄, 50mM NaF and protease inhibitors) and submitted to immunoprecipitation (HA antibody MMS-101R, Covance, Princeton, USA). Immunoprecipitated HSP110-HA was added to the kinase reaction buffer in the presence of 100ng of recombinant STAT3 (SRP2062, Sigma Aldrich), 250µM adenosine triphosphate (ATP) (9804, Cell signaling). In some conditions, JAK2 kinase (25ng, Millipore, Molsheim, France) was added. After incubation (15 min, 26°C), Laemmli buffer was added to stop the reaction and the level of P-STAT3 was analysed by western blot.

Immunohistochemistry of STAT3 in HCT116 sub-clones xenograft. 10×10^6 HCT116 sub-clone cells were injected s.c. into the right flank of NOD/SCID mice (Charles River Laboratories, Wilmington, USA). Tumour growth was followed every second day for 3 weeks. Mice were sacrificed when tumours reached 800mm^3 . The mice were treated according to the guidelines of the Ministère de la Recherche et de la Technologie, France. Tumour sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in a graded series of alcohol solutions. Antigens were then unmasked and the slides incubated in pH 8,0 EDTA buffer (30 min, 95°C), cooled for 30 min, washed twice in PBS for 3 min and treated with 3% H_2O_2 -PBS for 15 minutes in order to inhibit endogenous peroxidases. After washes in PBS, the slides were saturated for 25 min in 3% BSA PBS. $150\mu\text{L}$ of primary P-STAT3 antibody (1:50) was deposited onto slides and left in a humidified chamber overnight at 4°C . After washing in PBS, secondary antibody (8114P, Cell signalling) was added for 30 minutes at room temperature. Slides were washed twice for 5 minutes in PBS and revealed using Novared kit (Vector, Burlingame, USA). Slides were washed twice in water for 5 minutes and counterstained with 10% Meyer's hematoxylin. After one wash in water, slides were dehydrated in 100% ethanol and in xylene for 30 seconds each. The slides were then observed using the Cell Observer station (Zeiss, Germany).

Immunohistochemistry of STAT3 and HSP110 in primary colon tumours. Briefly, $4\mu\text{m}$ sections of paraffin-embedded tissue samples were cut onto silane-treated Super Frost slides (CML, Nemours, France) and left to dry at 37°C overnight. Tumor sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in pure ethanol. Before immunostaining, antigen retrieval was performed by immersing sections in citrate buffer (pH 6.0) for HSP110 or in pH 8.0 EDTA buffer for P-STAT3 (15 min at 95°C), washed twice in PBS for 3 min and treated with 3% H_2O_2 -PBS for 15 minutes in order to inhibit endogenous peroxidases. After washing in PBS, slides were saturated for 25 min in 3% BSA PBS. Sections were then incubated for 1 hour at room temperature with antibody to HSP110 (dilution 1/1200; clone 5812, Leica Biosystems) and overnight at 4°C in a humidified chamber with antibody to P-STAT3 (dilution 1/70, clone D3A7, Ozyme). After washing in PBS, secondary antibody (8114P, Cell signaling) was added for 30 minutes at room temperature. Slides were washed twice for 5 minutes in PBS and revealed using Novared kit (Vector, Burlingame, USA). Slides were washed twice in

Lagrange A, et al.

water for 5 minutes and counterstained with 10% Meyer's hematoxylin. After one wash in water, slides were dehydrated in 100% ethanol and then in xylene for 30 seconds each.

Measurement of HSP110DE9 and Dystrophin mRNA levels by RT-PCR. Measurement of mRNA levels was performed as described previously (Durand et al, 2007). Oligonucleotide sequences used for HSP110DE9 were 5'CGCTACACGAATTCCAGCTGTGA3' and 5'-GCATGGTTTCGACTAAAGACTTCATGAACACT-3', for GAPDH 5'-CATTGACCTCACTACATGG-3' and 5'-GCCATGCCAGTGAGCTTCC-3', for dystrophin 5'-TTGGTGGGAAGAAGTAGAGGACTG-3' and 5'-GCAGTGCCTTGTTGACATTGTTTCAG-3'.

Measurement of HSP110 and NMD factor mRNA expression by transcriptome microarray.

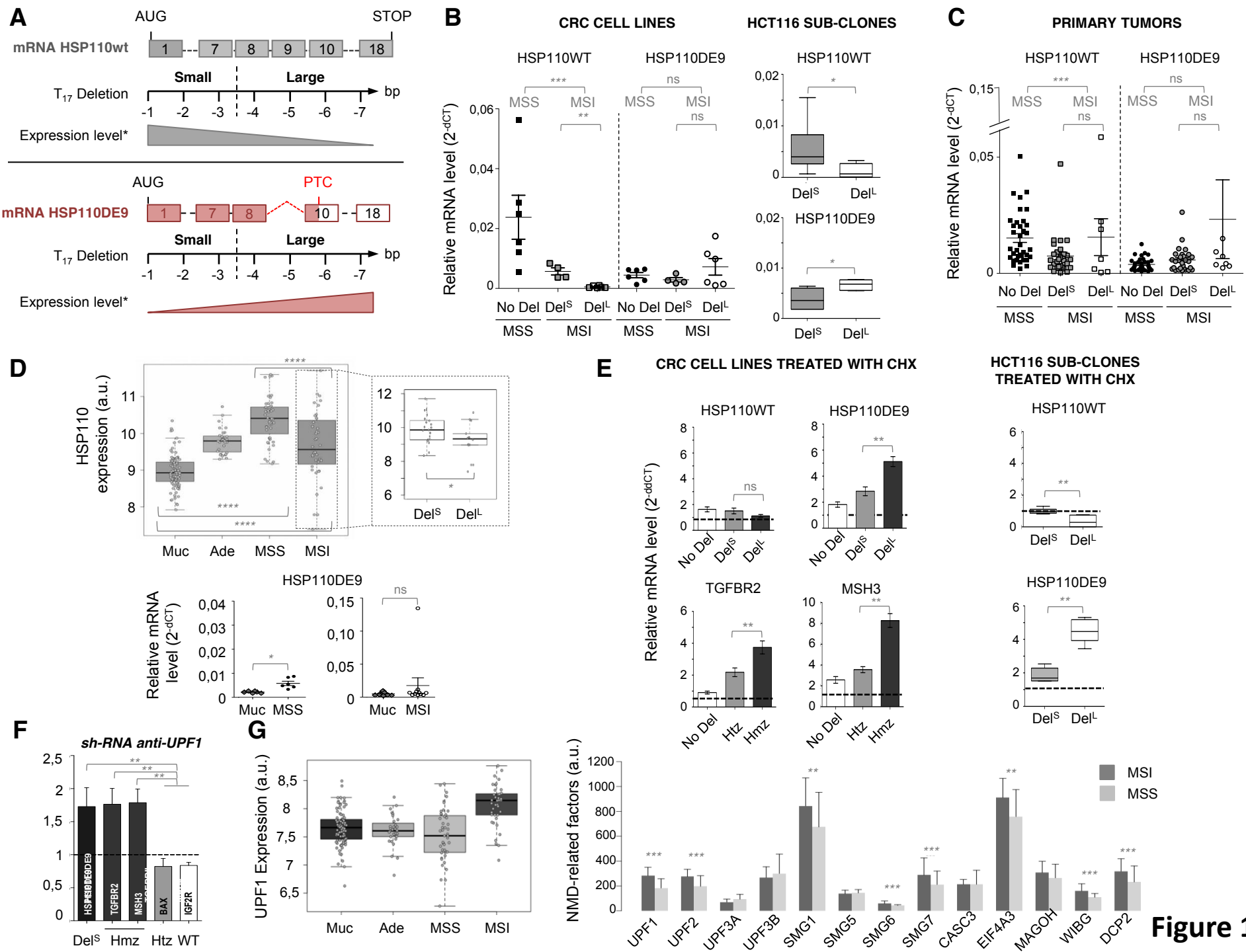
A large series of 40 MSI tumours, 48 MSS tumours and 42 normal colonic mucosa were screened for mRNA expression using Affymetrix U133Plus chips as previously described²⁷ (data partly in GSE33582 data set). Additional adenoma and mucosa samples were added from GSE8671 and GSE4183 data sets. Data were normalized together by Robust Multi-array Average normalization (R package affy). Associations with annotations were assessed by ANOVA or t-test (R package stats). Differential expression of NMD factors between tumour types were assessed by moderated t-test and FDR multiple testing correction (R package limma).

***In vitro* and *in vivo* effect of amlexanox.** *In vitro*, HCT116 and SW480 cell lines were incubated with increasing amounts of amlexanox for 24 hours prior to cell harvest and RNA extraction from the cytoplasmic fraction. *In vivo*, 5 week old nude mice were injected with 10⁷ cells (SW480 or HCT116) subcutaneously in the right back side. Around 5 days later when the tumour reached 4mm, an osmotic pump was introduced under the skin of each animal at the left back side. Osmotic pumps contained either a mock buffer made of 50% DMSO and 50% PEG400, or mock buffer with amlexanox. Tumour size was measured 3 times per week during 30 days. MDX mice harbouring a nonsense mutation in exon 23 of the dystrophin gene were injected subcutaneously with 1.2mg of amlexanox/kg for 24 hours prior to collection of back leg muscles, extraction of RNA and performing quantitative RT-PCR.

REFERENCES

- 1 Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363, 558-561 (1993).
- 2 Thibodeau, S. N., Bren, G. & Schaid, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science (New York, N.Y)* 260, 816-819 (1993).
- 3 Leach, F. S. *et al.* Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75, 1215-1225 (1993).
- 4 Duval, A. & Hamelin, R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer research* 62, 2447-2454 (2002).
- 5 Hamelin, R. *et al.* [Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers]. *Bulletin du cancer* 95, 121-132, doi:10.1684/bdc.2008.0571 (2008).
- 6 Suraweera, N. *et al.* Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 123, 1804-1811 (2002).
- 7 Buhard, O. *et al.* Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* 24, 241-251 (2006).
- 8 Giannini, G. *et al.* Mutations of an intronic repeat induce impaired MRE11 expression in primary human cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 23, 2640-2647 (2004).
- 9 Dorard, C. *et al.* Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nature medicine* 17, 1283-1289 (2011).
- 10 Collura, A. *et al.* Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Gastroenterology* 146, 401-411 e401, doi:10.1053/j.gastro.2013.10.054 (2014).
- 11 Olszak, T. *et al.* Protective mucosal immunity mediated by epithelial CD1d and IL-10. *Nature* 509, 497-502, doi:10.1038/nature13150 (2014).
- 12 Lykke-Andersen, J., Shu, M. D. & Steitz, J. A. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell* 103, 1121-1131 (2000).
- 13 Gehring, N. H. *et al.* Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements. *Molecular cell* 20, 65-75 (2005).
- 14 Chan, W. K. *et al.* An alternative branch of the nonsense-mediated decay pathway. *The EMBO journal* 26, 1820-1830, doi:10.1038/sj.emboj.7601628 (2007).
- 15 Holbrook, J. A., Neu-Yilik, G., Hentze, M. W. & Kulozik, A. E. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nature genetics* 36, 801-808 (2004).
- 16 El-Bchiri, J. *et al.* Differential nonsense mediated decay of mutated mRNAs in mismatch repair deficient colorectal cancers. *Human molecular genetics* 14, 2435-2442 (2005).

- 17 El-Bchiri, J. *et al.* Nonsense-mediated mRNA decay impacts MSI-driven carcinogenesis and anti-tumor immunity in colorectal cancers. *PLoS ONE* 3, e2583 (2008).
- 18 Saito, Y. *et al.* Nmi interacts with Hsp105beta and enhances the Hsp105beta-mediated Hsp70 expression. *Experimental cell research* 327, 163-170, doi:10.1016/j.yexcr.2014.07.023 (2014).
- 19 Yamagishi, N., Fujii, H., Saito, Y. & Hatayama, T. Hsp105beta upregulates hsp70 gene expression through signal transducer and activator of transcription-3. *The FEBS journal* 276, 5870-5880, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07311.x (2009).
- 20 Gonzalez-Hilarion, S. *et al.* Rescue of nonsense mutations by amlexanox in human cells. *Orphanet journal of rare diseases* 7, 58, doi:10.1186/1750-1172-7-58 (2012).
- 21 Slaby, O. *et al.* Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncology reports* 21, 1235-1241 (2009).
- 22 Kim, J. H. *et al.* Expression status of wild-type HSP110 correlates with HSP110 T deletion size and patient prognosis in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, doi:10.1038/modpathol.2013.160 (2013).
- 23 Ionov, Y., Nowak, N., Perucho, M., Markowitz, S. & Cowell, J. K. Manipulation of nonsense mediated decay identifies gene mutations in colon cancer Cells with microsatellite instability. *Oncogene* 23, 639-645 (2004).
- 24 Ballal, V. & V, J. Oral medicine: Amlexanox. *British dental journal* 217, 208, doi:10.1038/sj.bdj.2014.770 (2014).
- 25 Reilly, S. M. *et al.* An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK-varepsilon improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice. *Nature medicine* 19, 313-321, doi:10.1038/nm.3082 (2013).
- 26 Belenguer-Guallar, I., Jimenez-Soriano, Y. & Claramunt-Lozano, A. Treatment of recurrent aphthous stomatitis. A literature review. *Journal of clinical and experimental dentistry* 6, e168-174, doi:10.4317/jced.51401 (2014).
- 27 Marisa, L. *et al.* Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS medicine* 10, e1001453, doi:10.1371/journal.pmed.1001453 (2013).



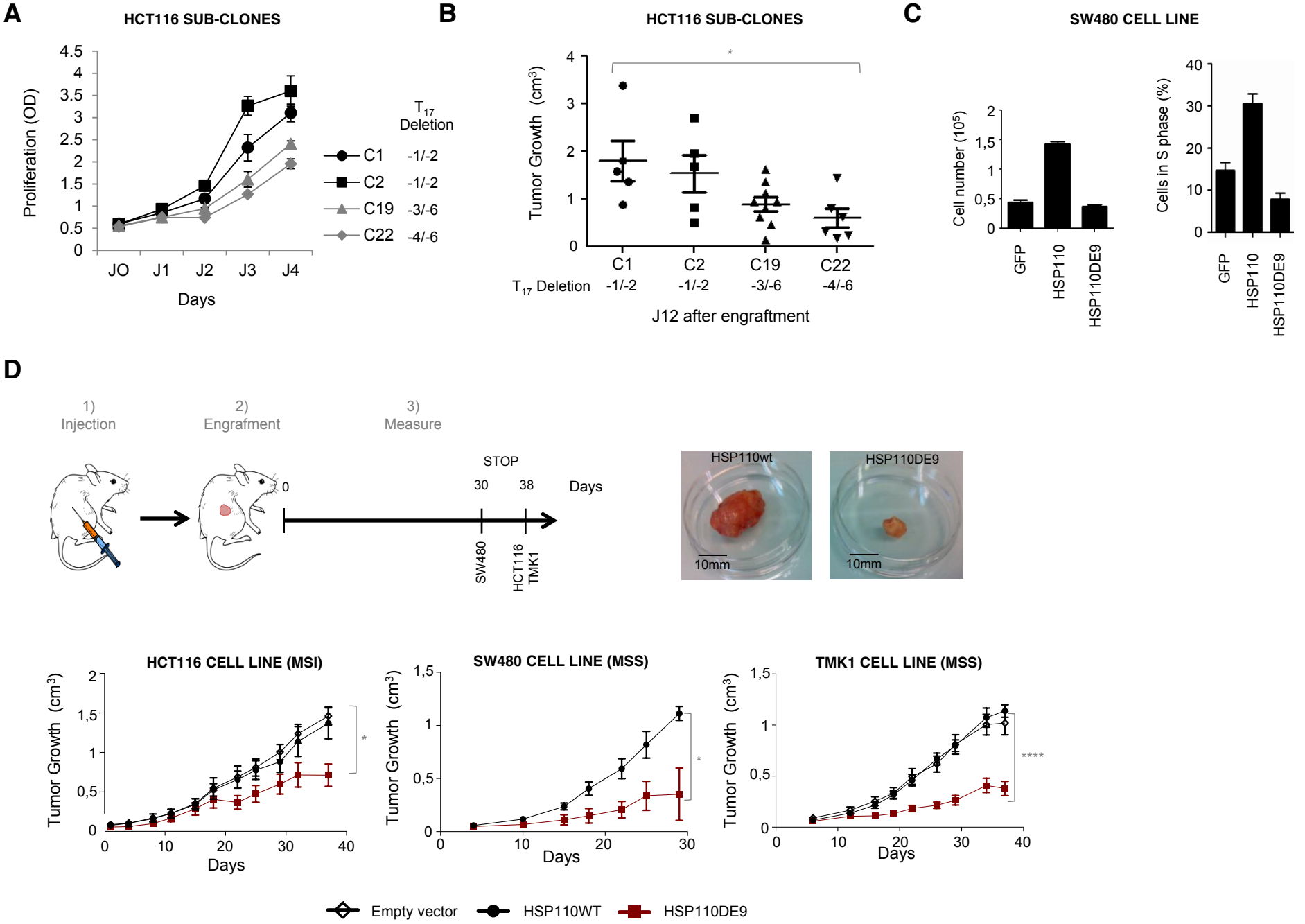


Figure 2

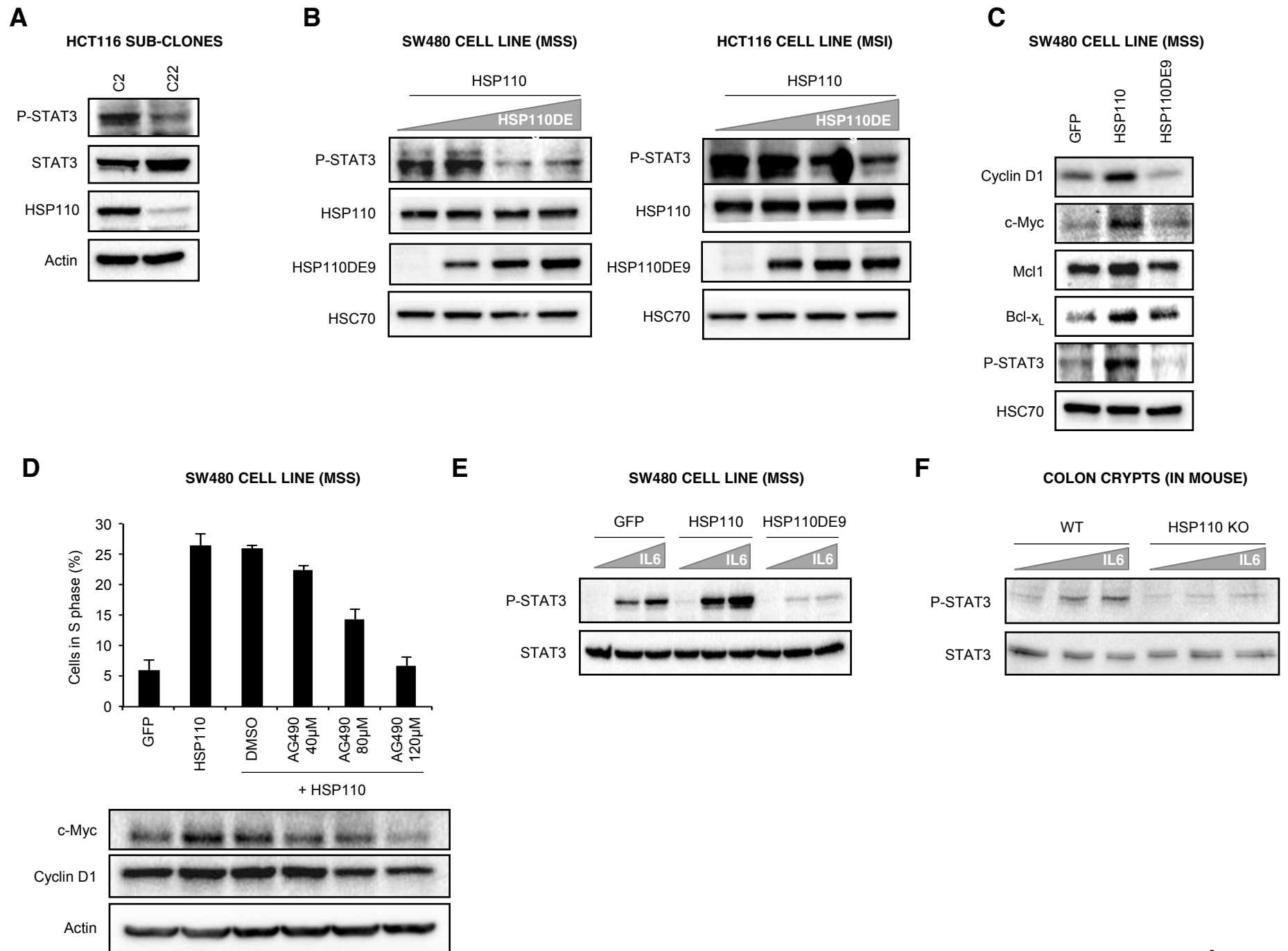
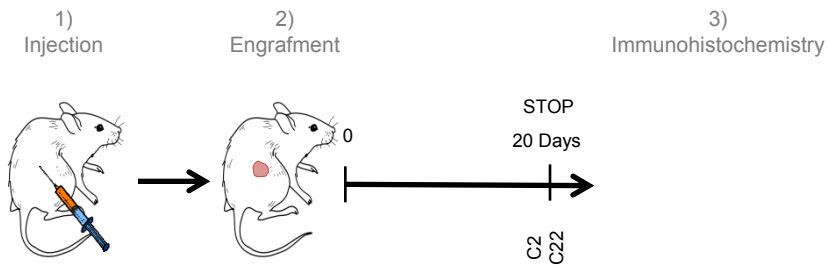
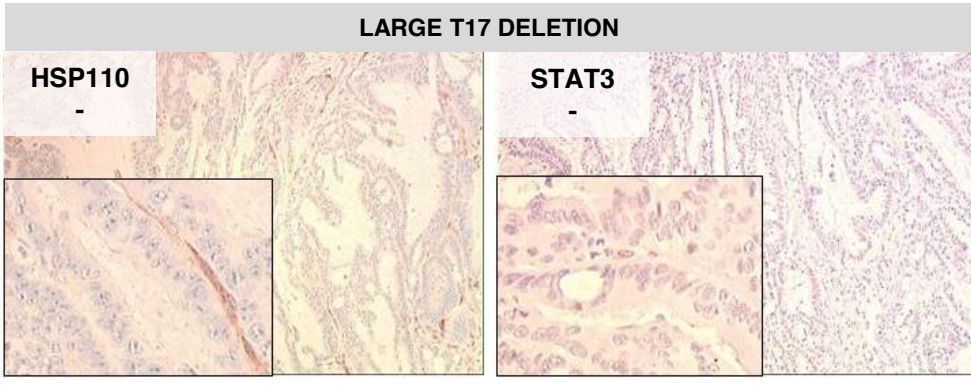
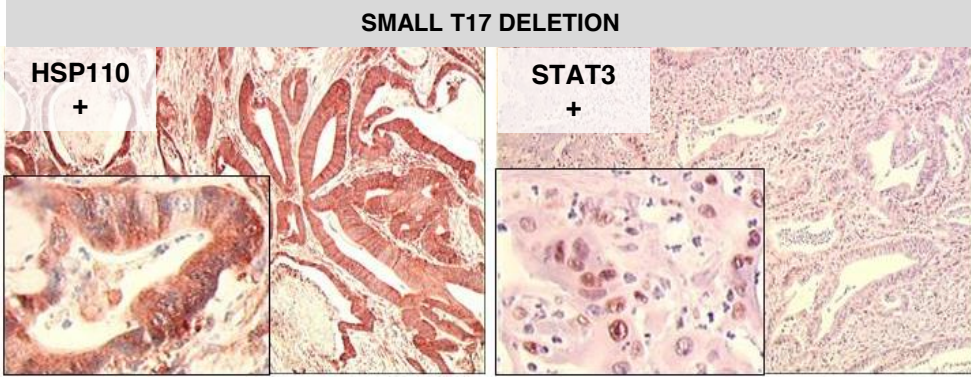
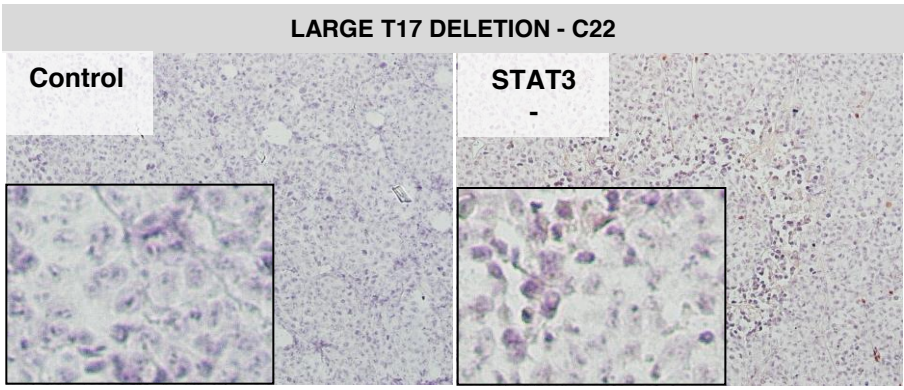
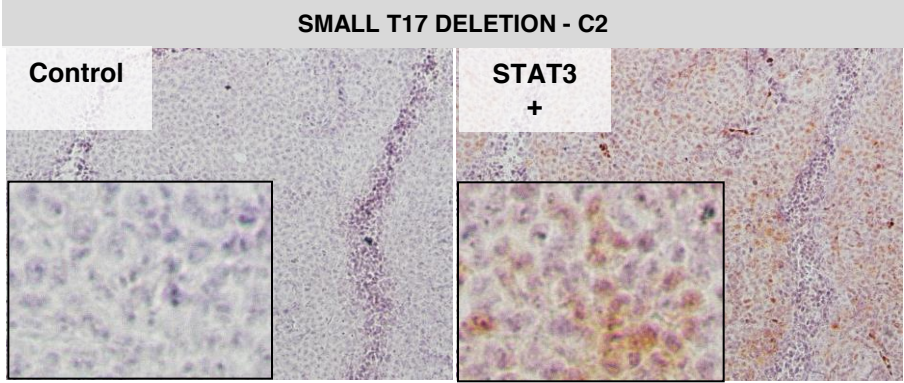


Figure 3

A**HCT116 SUB-CLONES XENOGRRAFT****B****PRIMARY TUMORS**

		STAT3		T17 Deletion	
		+	-	Del ^S	Del ^L
HSP110	+	17	8	17	9
	-	3	9	3	9

$p = 0.032$ $p = 0.035$

**Figure 4**

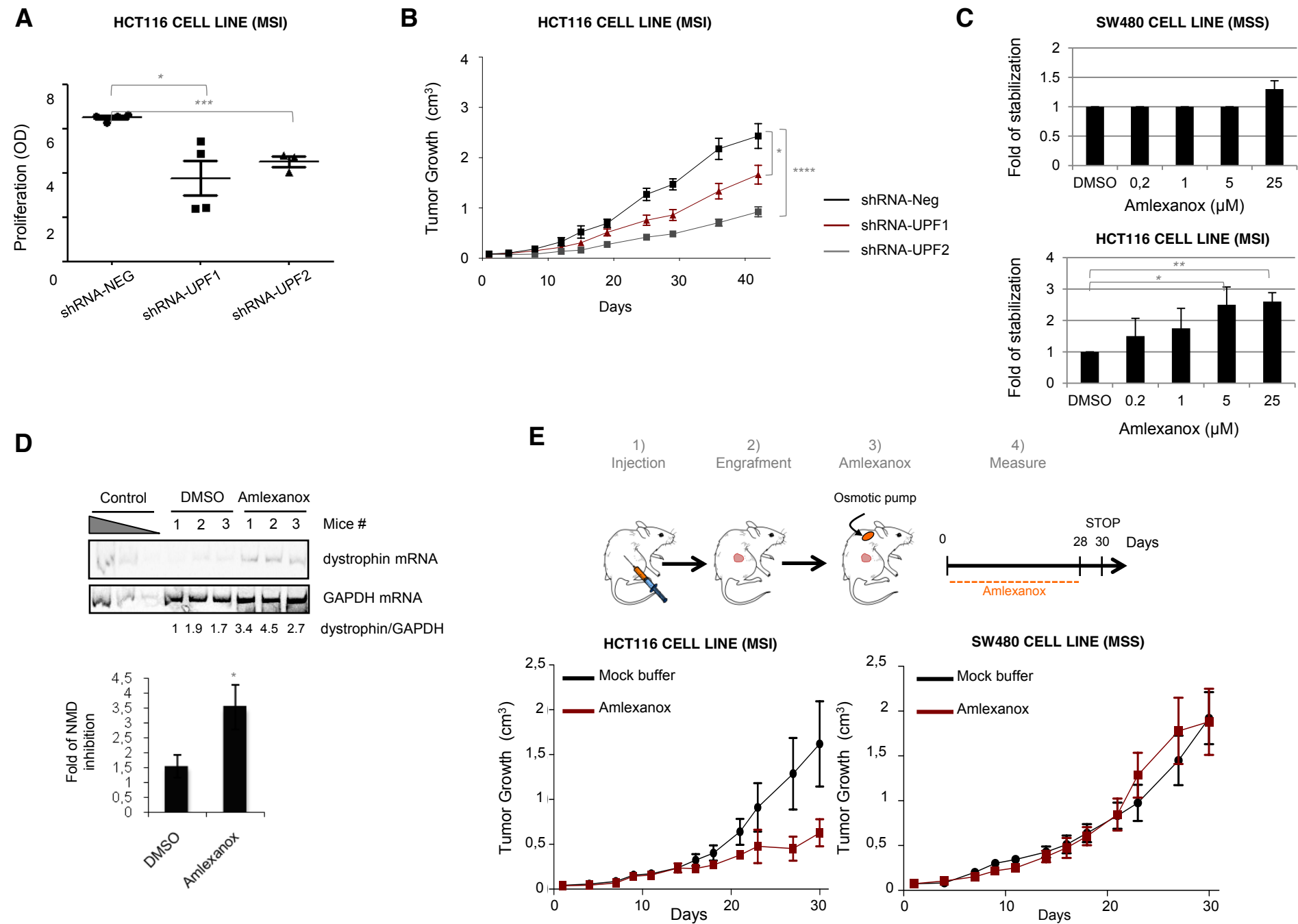
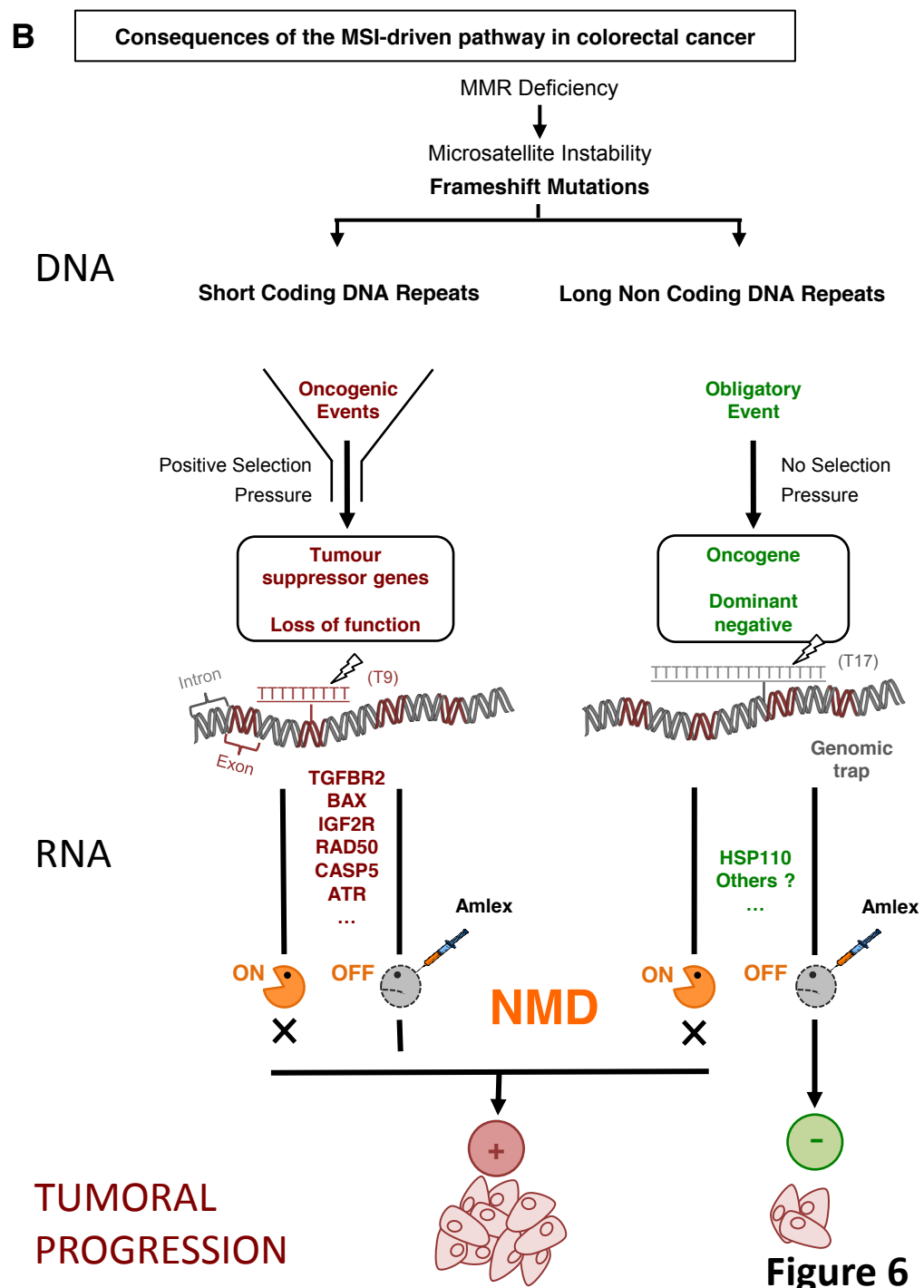
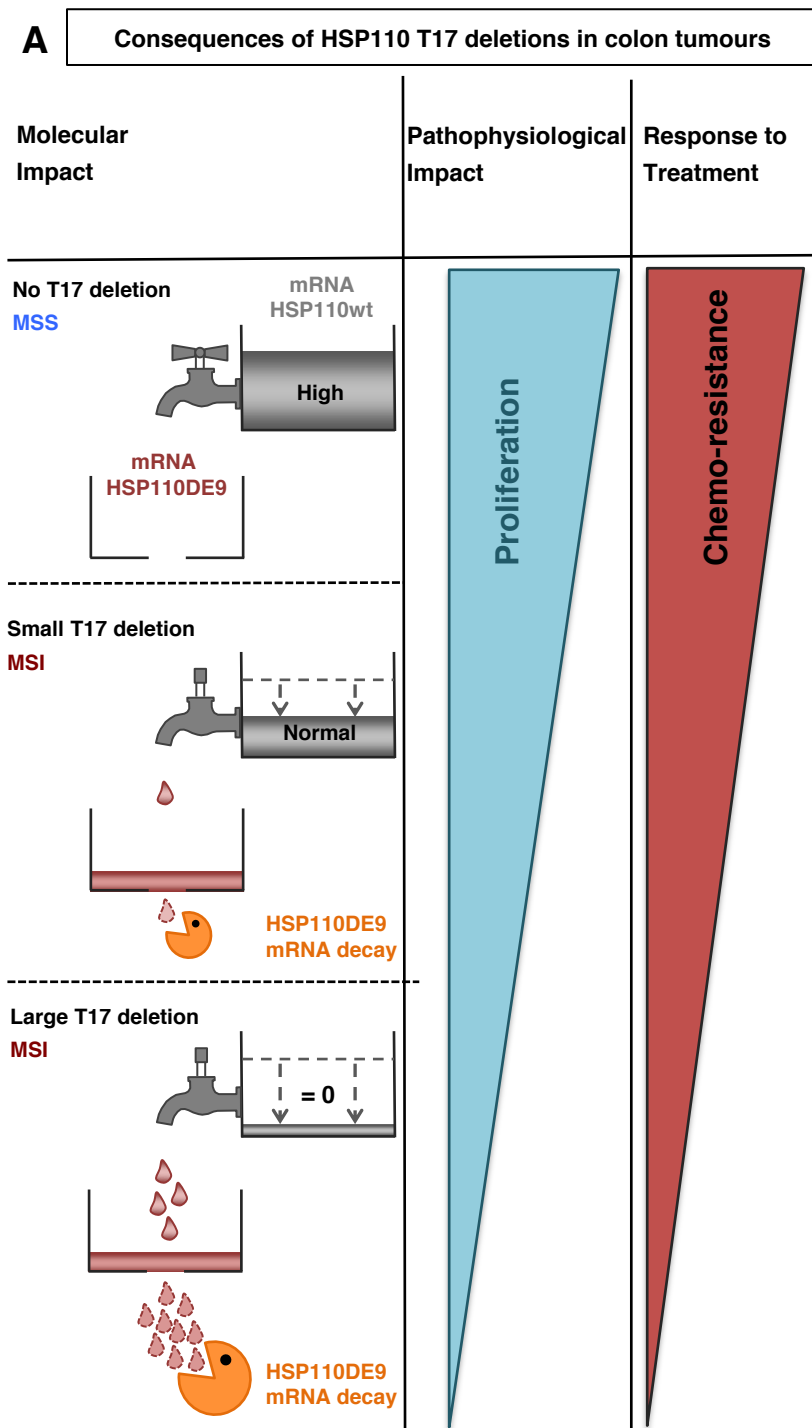
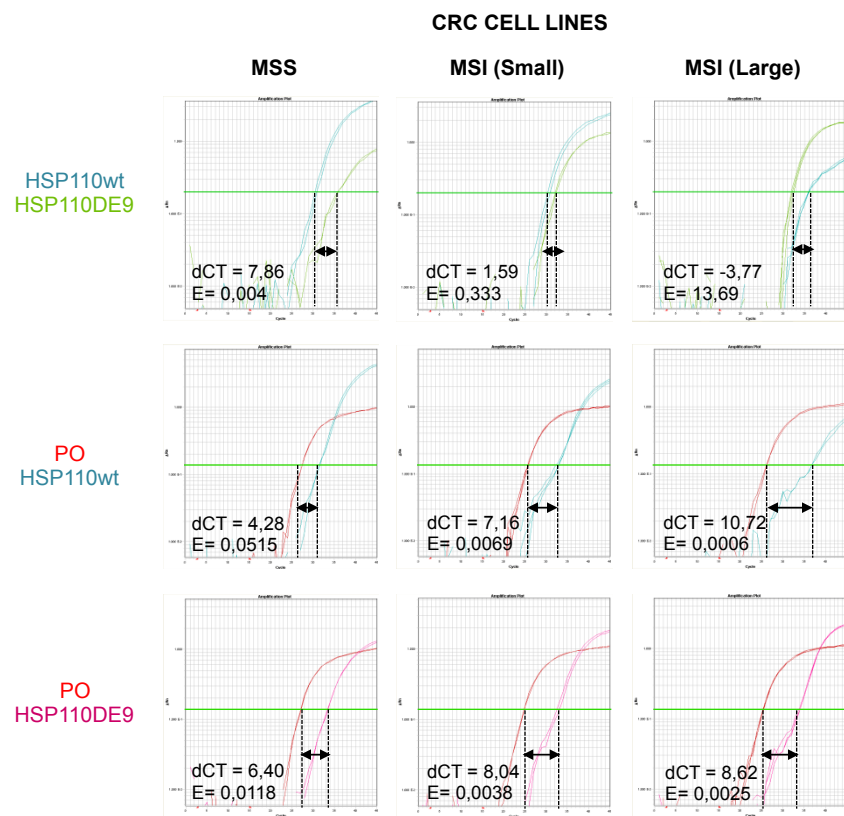
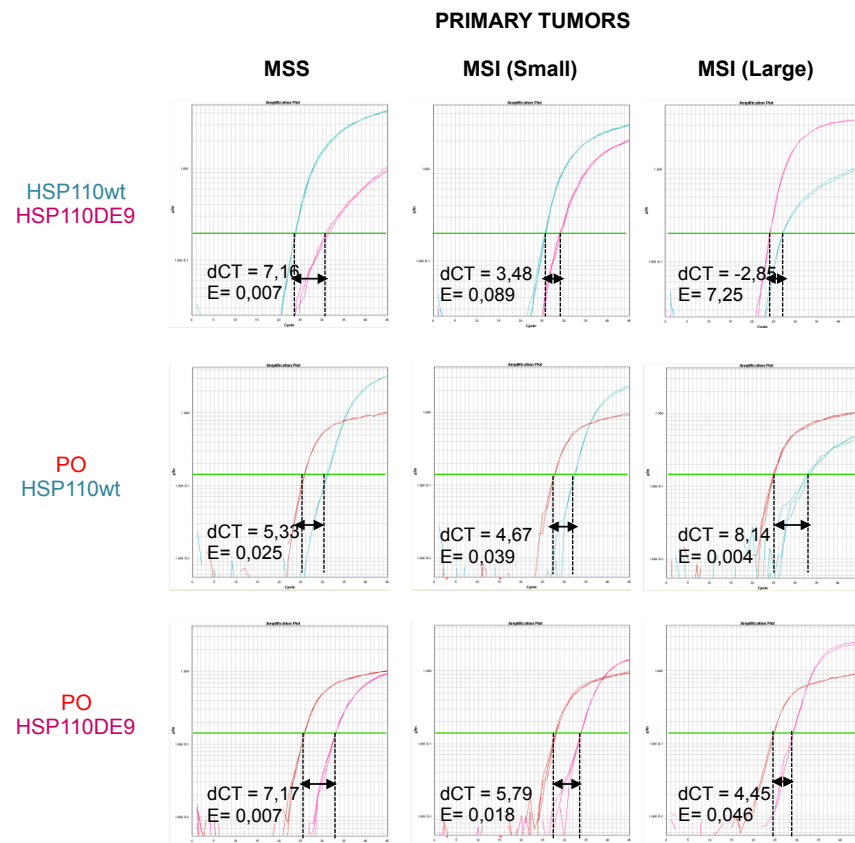
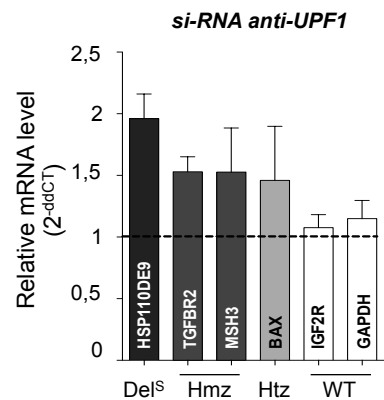


Figure 5



A**B****C****Figure S1**

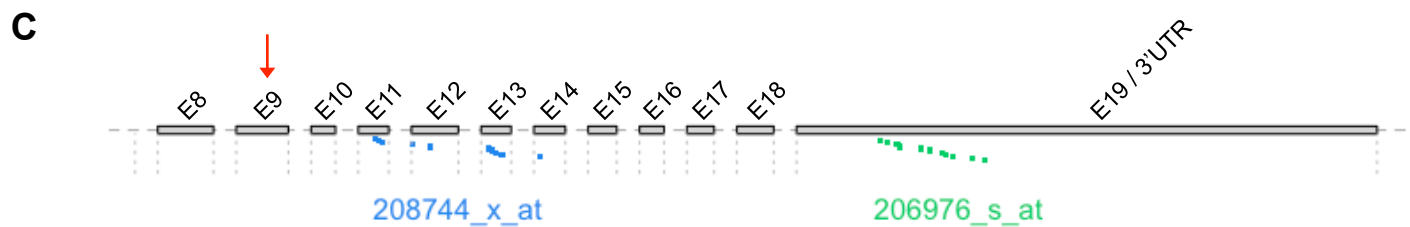
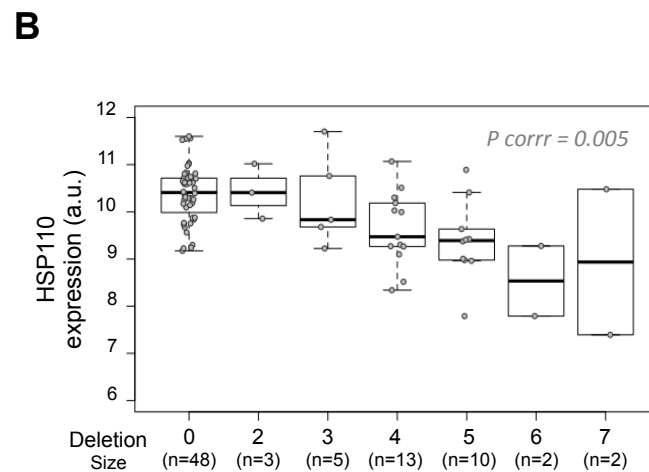
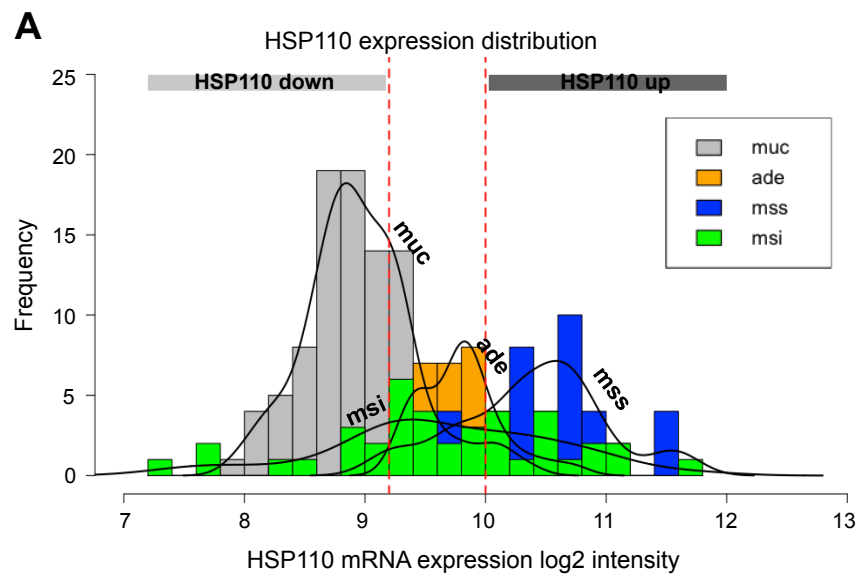


Figure S2

ARTICLE 4

**HSP110 T₁₇, a next generation marker for the detection of
microsatellite instability in colorectal cancer.**

(En soumission)

HSP110 T17, A NEXT GENERATION MARKER FOR THE DETECTION OF MICROSATELLITE INSTABILITY IN COLORECTAL CANCER

Olivier Buhard ^{1,2}, Anaïs Lagrange ^{1,2}, Agathe Guilloux ^{1,2}, Mouna Chouchène ^{1,2}, Kristell Wanherdrick ^{1,2}, Chrystelle Colas ^{1,2}, Florence Coulet ^{1,2}, Coralie Dorard ^{1,2}, Laetitia Marisa ³, Nizar El-Murr ^{1,2}, Sahra Bodo ^{1,2}, Martine Muleris ^{1,2}, Isabelle Sourouille ^{1,2}, Clothilde Debove ^{1,2,4}, Magali Svrcek ^{1,2,4}, Hélène Blanché ⁵, Howard Cann ⁵, Jérémie H Lefevre ^{1,2,6}, Yann Parc ^{1,2,6}, Come Lepage ^{7,8}, Caroline Chapusot ^{7,8}, Anne-Marie Bouvier ^{7,8}, Marie-Pierre Gaub ⁹, Gérard Milano ¹⁰, Janick Selves ¹¹, Kerry Garret ¹², Barry Iacopetta ¹³, Richie Soong ¹⁴, Richard Hamelin ^{1,2}, Olivier Lascos ^{2,15}, Jean-François Fléjou ^{1,2,4}, Carmen Garrido ^{8,16}, Ada Collura ^{1,2,€}, Alex Duval ^{1,2, €, £}

- (1) INSERM, UMRS 938 - Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe "Instabilité des Microsatellites et Cancers", Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, F-75012, Paris, France;
- (2) Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France;
- (3) Programme "Cartes d'Identité des Tumeurs", Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France;
- (4) AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France;
- (5) Fondation Jean Dausset-CEPH, Paris, France;
- (6) AP-HP, Service de Chirurgie Générale et Digestive, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France ;
- (7) Burgundy Cancer Registry, INSERM U866, Burgundy University, Dijon University Hospital, BP 87900 21079 Dijon, France;
- (8) INSERM UMR 866, Faculty of Medicine. University of Burgundy, Dijon, France;
- (9) INSERM, U682, Développement et Physiopathologie de l'Intestin et du Pancréas, 67200 Strasbourg, France;
- (10) Laboratoire d'Oncopharmacologie, EA 3836, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France ;
- (11) INSERM, Unité 563, Centre de Recherche sur le Cancer de Toulouse, France;
- (12) Bendat Family Comprehensive Cancer Centre, St John of God HealthCare, Subiaco, 6008 Australia;
- (13) School of Surgery M507, University of Western Australia, 35 Stirling Hwy, Nedlands, 6009, Australia;
- (14) Cancer Science Institute of Singapore, National University of Singapore, Singapore;
- (15) AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaires, F-75012, Paris, France
- (16) Centre de lutte contre le cancer George-François Leclerc, Dijon, France;

€ Co-leadership

£ Address for correspondence: Alex Duval

Emails: alex.duval@inserm.fr

Conflicts of interest : The authors disclose no conflicts.

ABSTRACT

Background

The T17 DNA repeat (HT17) is relevant for correct splicing of the chaperone HSP110. HT17 deletion is a putative predictive marker for the response of CRC patients to chemotherapy. Here we hypothesized that HT17 might also be relevant for routine MSI testing in CRC.

Methods

HT17 was analyzed in 1,037 germline DNAs and in 685 primary CRCs that were previously analyzed using a standard reference panel (pentaplex) for the determination of MSI. Discordant HT17/pentaplex cases were further examined to confirm their MMR-deficient status by evaluating MMR protein expression and additional microsatellite mutations. Sensitivities and specificities were assessed using statistical methods adapted to a partially observed gold standard.

Results

HT17 displayed no germline allelic variations outside a narrow, quasimonomorphic range. For the 366 tumor DNAs determined by pentaplex to show microsatellite stability, the HT17 profiles were normal for all cases except 14 that were subsequently confirmed to be MMR-deficient. The 313 MSI tumors identified by pentaplex all showed aberrant HT17 profiles with the exception of 4 cases that were subsequently confirmed as MMR-deficient. Analysis of HT17 allowed the correct classification of 6 samples that showed doubtful status using pentaplex. Compared to the pentaplex panel, HT17 offered better sensitivity, *i.e.* 0.984 (95% CI 0.968-0.995) vs 0.951 (95% CI 0.925-0.972) (one sided $P = .005$) and similar specificity, *i.e.* 0.997 (95% CI 0.989-1.000) for both (two-sided $P = .5$).

Conclusion

These results provide a strong rationale for the inclusion of HT17 in future screening of MSI in CRC.

Approximately 10-15% of sporadic colorectal cancers (CRCs) show the microsatellite instability phenotype (MSI) ¹⁻³. MSI is also found in the great majority of tumors from the Lynch cancer syndrome (for review, see ^{4,5}) and is a marker of an underlying mismatch repair (MMR) defect. CRC with MSI have distinctive molecular and clinicopathological profiles and are often associated with favorable prognosis ^{4,6,7}. Some workers have also suggested that CRCs displaying MSI do not respond to 5-Fluorouracil based chemotherapy ⁸⁻¹⁰.

The methods and criteria used to determine the MSI phenotype in CRC have constantly evolved since this phenotype was initially described. Currently, evaluation of MSI status is based on the screening of tumor DNA for somatic deletions in long, non-coding DNA repeats. These markers are somewhat polymorphic in the general population, although we and others have demonstrated that some show very little variation ¹¹. In an effort to standardize MSI analysis in CRC, a workshop at the National Cancer Institute (NCI) in 1998 recommended the use of a panel of 5 markers, comprising 3 dinucleotide repeats and 2 mononucleotide repeats ¹². Tumors with instability at two or more of these markers were defined as being MSI-H (high) due to underlying MMR deficiency. Tumors showing instability at one or none of the repeats were defined as MSI-L (low) and MSS, respectively, and deemed to be MMR-proficient. In 2002, we proposed a panel of 5 mononucleotide repeats (pentaplex) that obviated the need to simultaneously analyze germline DNA from each CRC patient ¹¹. This panel was subsequently approved by the NCI ¹³ and we later demonstrated better specificity and sensitivity compared to the NCI panel of markers for the screening of MSI ¹⁴. The minimum number of unstable markers required to define colon tumors as MSI with the pentaplex panel was initially 4 out of 5. However, recent work has demonstrated that just 2 unstable markers are sufficient to classify colon tumors as MSI with this method ¹⁵.

More recently, we found the T17 mononucleotide repeat of *HSP110* (HT17) was mutated at high frequency in MSI CRC ¹⁶. In contrast to deletions in markers from the NCI and pentaplex panels, shortening of the HT17 repeat in tumor DNA correlated with increased synthesis of a variant HSP110 isoform due to exon 9 skipping (HSP110DE9) ^{16,17}. HSP110 is a conserved and abundant molecular chaperone whose expression is induced by a specific set of stress conditions. Somatic deletion in HT17 was shown to increase the sensitivity of cancer cell lines to anticancer agents such as oxaliplatin and 5-FU. In line with these results, we showed that large HT17 deletions (≥ 5 bp) observed in about 25% of all MSI CRC patients were predictive of good response to 5-FU based chemotherapy ¹⁷. In the present work, we investigated whether HT17 could be used to further improve and simplify the currently used detection methods for MSI in colon cancer.

MATERIALS AND METHODS

ETHICS STATEMENT, PATIENTS AND DNA SAMPLES

This study was approved by the institutional review board/ethics committee of the participating centers. The Human Genome Diversity panel (HGDP) is a collection of immortalized lymphoblastoid cell lines (LCL) ^{14,18}. A set of unrelated Caucasian DNA samples selected from the 'Centre d'Etude du Polymorphisme Humain' (CEPH) Reference Families was also used. HGDP and CEPH Reference Families DNAs were extracted from LCL as described ¹⁷. All tumor DNAs were extracted using the QIAamp DNA Tissue Kit (Qiagen) from

fresh or paraffin-embedded tissue samples. MSI determination was first carried out using pentaplex PCR as described earlier¹⁴. All MSI tumors (*i.e.* samples showing at least 2 unstable pentaplex markers) from patients who underwent surgical resection for CRC from 1998 to 2007 at one of the 6 centers involved in the study were further analyzed for determination of their HT17 status. In addition, HT17 status was determined in a series of tumors from the same clinical centers for which DNA material was available and that displayed either an MSS (*i.e.* samples showing 0 or 1 unstable markers) or doubtful (*i.e.* incomplete profiles) microsatellite status by pentaplex. All markers were analyzed on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions (Supplementary **Table S1**).

DETERMINATION OF THE HT17 STATUS OF SAMPLES

After migration of 1 to 3 µl of the PCR products on a ABI 3100 Genetic Analyzer with GS400HD ROX size standard and POP-7 polymer (Applied Biosystems), GeneMapper V4.0 software (Applied Biosystems) was used to analyze HT17 traces, applying an AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) method with the following parameters: annotation of all peaks between 138 and 150 bp, generation of the panel based on all analyzed samples, normalization method using the sum of the signals. HT17 traces were considered as acceptable when amplitudes of the major peaks were between 100 and 6,000 fluorescence units. Additionally, we also calculated height ratios between peaks, especially between T14 and T16 (R1) and between T15 and T16 (R2). An MSI-HT17 Perl script was designed to analyze HT17 traces automatically (see Supplementary **Materials**). This software allows detection of aberrant HT17 peaks outside the QMVR (quasimonomorphic variation range) and has been designed to calculate the threshold values for R1 and R2 ratios.

ANALYSIS OF DISCORDANT RESULTS BETWEEN THE PENTAPLEX PANEL AND HT17 AND ASSESSMENT OF TRUE NEGATIVE (MSS) AND TRUE POSITIVE (MSI) CASES

Tumor samples that displayed discordant results were further analyzed to confirm their microsatellite status. We examined 15 genes containing a mononucleotide repeat sequence in the coding region (*ATR*, *BAX*, *BLM*, *CDX2*, *GRB14*, *GRK4*, *MBD4*, *MSH3*, *MSH6*, *RAD50*, *RECQL*, *RIZ*, *SLC35F5*, *TFDP2*, and *TGFBR2*)⁴ and/or assessed the expression of MMR proteins, (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2) by immunohistochemistry (IHC) as described earlier¹⁹. IHC was also used to assess the microsatellite status of tumors that displayed either concordant positive (MSI, *N*= 104, true positives) or negative (MSS, *N*= 18, true negatives) pentaplex/HT17 profiles.

STATISTICAL ANALYSIS

The diagnostic accuracy of the HT17 and pentaplex tests was estimated using a latent class model formulation^{20,21}. In the saturated model, the joint distribution of the two tests and of the gold standard was assumed to be multinomial with eight categories, corresponding to all possible observations. The multinomial parameters were the prevalence of MSI status and the sensitivities and specificities of the two tests. Hastings-Metropolis²² and expectation-maximization²³ algorithms were run on the data to estimate the 5 parameters, two-sided confidence intervals and test *p*-values. A detailed description of the model and related estimation is given in the Supplementary Methods.

RESULTS

Multiethnic Germline DNA Profiling of the HT17 Microsatellite. HT17 genotyping was performed in 1,037 samples from the HGDP-CEPH diversity panel representing 54 worldwide populations from 29 geographic regions (**Table 1**). Overall, the HT17 DNA repeat was remarkably monomorphic, with the size of normal alleles ranging from 145 bp (T16) to 147 bp (T18). Only 3 individuals (3/1,037, 0.3%) displayed the T18 allele (**Table 1** and Supplementary **Figure S1**). Three canonic profiles were observed: T16/T16 (135/1,034; 13%), T16/T17 (304/1,034; 29.4%), and T17/T17 (595/1,034; 57.6%) (**Fig. 1A**). The 3 individuals displaying the T17/T18 genotype are not represented. The extent of stuttering by Taq polymerase observed for HT17 (2 bp) was only half that observed for the longer MSI markers from the pentaplex panel (4 bp, **Fig. 1B**). Moreover, the QMVR for each marker from the pentaplex panel was much larger than for HT17 (**Table 2** and **Fig. 1C**). Additionally, all 5 pentaplex markers displayed allelic variants outside the QMVR, whereas no amplification products were observed outside the narrow QMVR for HT17 in the same worldwide populations (**Table 2** and **Fig. 1D**). The data analysis pertains to all samples and thus concerns 2,074 alleles. **Table 2** summarizes the percentage of each allelic size variant within or outside the QMVR for HT17 and for each of the 5 pentaplex markers in the complete worldwide series.

Determination of HT17 status in Colon Tumors. The height ratios between the T14 and T15 stutter peaks and the T16 peak in germline DNA never exceeded 0.15 and 0.5, respectively, regardless of the HT17 genotype ($R1=T14/T16$, $R2=T15/T16$; **Fig. 2A**, left panel). In the present series of 685 tumors (666 CRCs, 19 adenomas), the HT17 status was analyzed independently and without taking into account previous results from pentaplex genotyping.

No aberrant HT17 profiles were detected in 352 of the 366 tumors that displayed unambiguous MSS status with the pentaplex panel. Amongst the remaining 14 cases, 9 displayed aberrant HT17 alleles that fell outside the QMVR (**Fig. 3A** and Supplementary **Figure S2A**), while 5 tumors showed no aberrant peaks but abnormal R1 and/or R2 ratios (MSI(R) cases, **Fig. 2A**, right panel, **Fig. 2B**, **Fig. 3B** and Supplementary **Figure S2B**). These 14 tumors were all confirmed to be MMR-deficient by IHC (**Table 3** and data not shown). Apart from sample PA-059, all 14 tumors showed high levels of contamination with normal DNA (**Fig. 3**).

With the exception of 4 cases, all 313 tumors classified as MSI with the pentaplex method (i.e. at least 2 unstable markers) showed aberrant HT17 profiles. Aberrant peaks outside the QMVR and measuring up to 7 base pairs were detected in 307 cases, while 2 cases displayed aberrant R1 and R2 ratios (MSI(R) cases, Supplementary **Table S1**). Here again, the 4 MSI samples for which an aberrant HT17 profile was not detected displayed high levels of contamination with normal DNA (Supplementary **Figure S3**).

Finally, 6 tumor samples in this series were classified as having a “doubtful” MSI status with the pentaplex panel (**Table 3**). Amongst these, aberrant deletions in HT17 were detected in 4 cases and MMR deficiency was further confirmed by IHC in one case with available tissue (**Table 3**). Furthermore, all 4 cases were confirmed as MSI because they displayed frameshift alteration(s) in at least one coding DNA repeat contained in relevant target genes for MSI (**Table 3**). In the remaining 2 samples, neither aberrant HT17 allelic

profiles nor frameshift target gene mutations were detected and hence it was concluded they were probably MSS.

Sensitivity and Specificity of the HT17 and Pentaplex Markers for the Detection of MSI in Colon Tumors. The statistical analysis was conducted on the 679 tumor samples that showed an unambiguous MSI status with pentaplex and were further analyzed with HT17. Eighteen and 104 tumors that displayed unambiguous MSS (true negatives) or MSI (true positives) status with both pentaplex and HT17 were also shown by IHC to be MMR-proficient or MMR-deficient, respectively (data not shown). Eighteen samples displayed discordant results using the two methods (see above). Compared to the reference pentaplex panel, HT17 offered significantly better sensitivity ($P = .005$), *i.e.* 0.984 (95% confidence interval 0.968-0.995) vs 0.951 (95% CI 0.925-0.972), while showing similar specificity ($P = .5$), *i.e.* 0.997 (95% CI 0.989-1.000) (**Table 4** and Supplementary **Methods**). As expected, when a threshold of 3 unstable markers rather than 2 was used to classify MSI with the pentaplex method, the difference between sensitivities ($P < .00001$) and specificities ($P = .084$) of both methods reached higher levels of significance to the benefit of HT17 (see Supplementary **Table S2** and **Table 4**).

DISCUSSION

The screening of CRC for MSI status is recommended for all newly diagnosed colon tumors and in many institutes this has become routine for CRC patients diagnosed under the age of 60 years. The pentaplex method is one of the most widely used MSI screening techniques in the clinic and allows the detection of MSI without the requirement for matching normal DNA. Nevertheless, pentaplex markers sometimes display germline allelic variants outside QMVRs, thus mimicking MSI^{14,15}. Consequently, aberrant variants in at least 2 markers must be observed for the diagnosis of MSI in a given tumor sample. However, the minimum number of unstable markers required to define colon tumors as MSI with the pentaplex method is still controversial. Moreover, a small proportion of the somatic mutations that occur in these markers do not lead to a diagnosis of MSI since they comprise only short deletions or insertions that remain within the QMVR^{14,15}. In contrast, HT17 was found here to be highly monomorphic, showing a narrower QMVR than all 5 pentaplex markers and displaying only 2 alleles in 99.7% of individuals from the same HGDP-CEPH panel used to assess variation in the pentaplex markers. Overall, HT17 was significantly more sensitive than the pentaplex method for the detection of MSI in CRC, while having the same level of very high specificity. The sensitivity of the pentaplex method was further reduced when 3 unstable markers rather than 2 was used as the cut-off. These results further confirm the very high sensitivity of the HT17 marker for the detection of MSI in colon tumors.

The exceptional sensitivity and specificity of HT17 may be due to several factors. The stuttering of Taq polymerase observed at the HT17 DNA repeat was significantly less than for the pentaplex markers, probably due to the smaller size of HT17 (16/17 nucleotides vs 21-27 nucleotides). This allowed us to refine the interpretation of HT17 profiles by developing a quantitative method, termed MSI-Ratio, that evaluates the ratio between peaks for the QMVR and stutter bands when no aberrant peaks are present outside the QMVR. A recent publication based on the analysis of dinucleotide repeats described a similar quantitative approach to detect the MSI phenotype in the germline DNA of patients affected

by the rare and severe constitutive MMR-deficiency syndrome ²⁴. For several reasons, this approach cannot be used to detect MSI using DNA repeats from the pentaplex panel.

One of the limitations for routine detection of MSI using PCR and AFLP of the HT17 repeat is contamination of the tumor with normal cells, as is frequently observed in MSI colon tumors with heavy lymphocytic infiltration. The 4 MSI samples in this study in which an aberrant HT17 profile was not detected displayed very low tumor DNA content, thus highlighting the need for a minimum tumor cell content in all samples. However, HT17 allowed the diagnosis of MSI in 14 primary tumors that were not detected by the pentaplex panel, 13 of which displaying high levels of contamination with normal DNA. HT17 is therefore likely to be more sensitive than pentaplex markers for the detection of MSI in cases with very low tumor DNA content. A possible limitation of the HT17 repeat may arise if the very rare HT17 T18 allele occurs at a significantly higher frequency in some populations, thus requiring the QMVR to be enlarged. Our genotype analysis of the HT17 repeat in many worldwide populations suggests this situation may occur in patients from New Guinea, China or Nigeria. However, the T18 allele undergoes aberrant deletions but not insertions in MSI tumors. This contrasts with germline allelic variants observed outside the QMVRs for pentaplex markers, which can be both larger and smaller.

In conclusion, the quasi monomorphism demonstrated here for HT17 is likely to account for the very high sensitivity and specificity of this marker for the detection of MSI in CRC. We speculate this lack of variation in normal DNAs may be due to its functional role in HSP110 splicing ¹⁶. In contrast to the pentaplex markers, reading of the HT17 profile is relatively straightforward and easy to interpret. Nevertheless, it is important to note that modification of the protocol used here to investigate the status of HT17 in colon tumors could alter the results. Consequently, it will be crucial to calibrate the method using non-tumor control DNA samples and the MSI-Ratio software developed by our group and publicly available. The exceptional sensitivity and specificity of HT17 make it an ideal DNA marker for the detection of MSI in CRC. For now, we recommend that HT17 be used alongside the standard pentaplex panel to identify MSI in CRC. However, we believe this marker will eventually become the new standard reference for the screening of MSI in CRC. Importantly, the HT17 genotype status was also recently proposed by our group as a putative predictive marker for the response of MSI colon cancer patients to 5-FU based therapies ¹⁷. Hence there is a strong rationale to include this novel DNA marker for screening of Lynch syndrome as well as for prediction of the response of MSI CRC to adjuvant therapies.

AD group have the label de « La Ligue Contre le Cancer ». This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer and by grants from the 'Institut National du Cancer' (INCa). AC is a recipient of an INCa fellowship (Institut National du Cancer).

REFERENCES

1. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* (New York, NY 1993;260:812-6.
2. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-38.

3. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
4. Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer research* 2002;62:2447-54.
5. Colas C, Coulet F, Svrcek M, et al. Lynch or not Lynch? Is that always a question? *Advances in cancer research* 2012;113:121-66.
6. Vasen HF, Moslein G, Alonso A, et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *Journal of medical genetics* 2007;44:353-62.
7. Gruber SB. New developments in Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) and mismatch repair gene testing. *Gastroenterology* 2006;130:577-87.
8. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *The New England journal of medicine* 2003;349:247-57.
9. Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, et al. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004;126:394-401.
10. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3219-26.
11. Suraweera N, Duval A, Reperant M, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002;123:1804-11.
12. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer research* 1998;58:5248-57.
13. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute* 2004;96:261-8.
14. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* 2006;24:241-51.
15. Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS ONE* 2010;5:e9393.
16. Dorard C, de Thonel A, Collura A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nature medicine* 2011;17:1283-89.
17. Collura A, Lagrange A, Svrcek M, et al. Patients With Colorectal Tumors With Microsatellite Instability And Large Deletions In Hsp110 T Have Improved Response To 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy. *Gastroenterology* 2013.
18. Cann HM, de Toma C, Cazes L, et al. A human genome diversity cell line panel. *Science (New York, NY)* 2002;296:261-2.
19. Svrcek M, El-Bchiri J, Chalastanis A, et al. Specific clinical and biological features characterize inflammatory bowel disease associated colorectal cancers showing microsatellite instability. *J Clin Oncol* 2007;25:4231-8.

20. Joseph L, Gyorkos TW, Coupal L. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *American journal of epidemiology* 1995;141:263-72.
21. Hui SL, Walter SD. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 1980;36:167-71.
22. Hastings WK. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika* 1970;57:97-109.
23. Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal statistical Society* 1977;39:1-38.
24. Ingham D, Diggle CP, Berry I, et al. Simple detection of germline microsatellite instability for diagnosis of constitutional mismatch repair cancer syndrome. *Human mutation* 2013;34:847-52.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Morphometric analysis of traces for HT17 and for the 5 pentaplex markers. **A:** Canonical profiles for the three main HT17 genotypes observed in the HGDP-CEPH population are shown, with the respective amplicon sizes indicated in base pairs. **B:** Comparative representation of stuttering artifacts for the six markers, including stutters for peaks shorter than the shortest allele annotated in each trace. **C:** Comparative representation of the QMVRs for the 6 markers. The grey band covers all possible amplicon sizes for each quasi-monomorphic marker. **D:** Sample traces of allelic variants outside the QMVR for the 6 markers. The red dotted lines indicate the minimum size of the QMVR. In B, C and D, the blue bars are for the pentaplex markers and the red bar for HT17. The values shown for the bar graphs (B, C, D) indicate the size in base pairs (stuttering, QMVR) or the shortest size (allelic variant outside QMVR).

Figure 2. Analysis of discordant results between the pentaplex panel (false negatives) and HT17. **A:** Distribution of R1 and R2 ratios for HGDP-CEPH normal and the MSS series, plotted separately according to the 3 main genotypes for HT17. The red lines indicate thresholds for the determination of instability (0.15 for R1, 0.5 for R2). The red dots represent the position of 5 false negative cases when MSI was evaluated with the pentaplex panel. **B:** Traces of 3 aberrant cases for the R1 and/or R2 ratios, plotted below traces of 3 normal samples (HGDP-CEPH panel) of the same genotype shown for comparison. The R1/R2 values shown in red exceed the respective thresholds.

Figure 3. Details of HT17 PCR traces for the 14 false negative cases by the pentaplex. **A:** Nine tumor samples are shown, displaying a normal pentaplex profile (not shown, see Supplementary Figure S2A) whereas aberrant HT17 alleles that fell outside the QMVR were observed. **B:** Five tumors displaying a normal pentaplex profile (not shown, see Supplementary Figure S2B) whereas abnormal R1 and/or R2 ratios in HT17, annotated MSI(R), were observed. These 14 tumors were all confirmed to be MMR-deficient by immunohistochemistry.

Table 1. Distribution of the 4 genotypes identified for HT17 in 1,037 individuals from the worldwide populations. The absolute and relative number of cases is shown for each geographic origin.

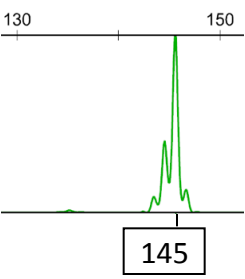
Table 2. Allelic sizes for each marker. Allelic sizes for HT17 were measured from the entire worldwide germline DNA series. Allelic sizes for the pentaplex markers were reported in our previous study on the same HGD panel. For each marker, alleles in the quasi-monomorphic variation ranges (QMVR) are shown in the dark gray boxes, while polymorphic alleles are in the light gray boxes.

Table 3. Analysis of samples with discordant or doubtful HT17/pentaplex profiles and assessment of their MSI status. Results are shown for 14 false negative cases with pentaplex markers, 4 false negative cases with HT17 and 6 cases annotated as “doubtful” with pentaplex markers.

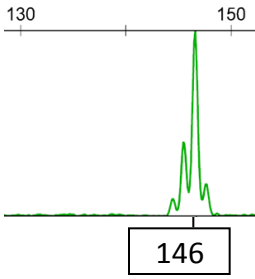
Table 4. Sensitivity, specificity and positive and negative predictive values for the determination of MSI by pentaplex markers and by HT17.

A

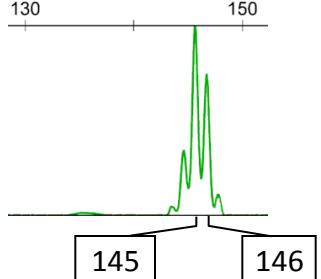
T16/T16
Homozygous



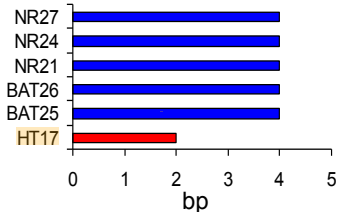
T17/T17
Homozygous



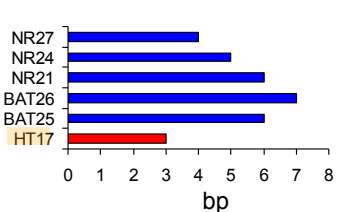
T16/T17
Heterozygous



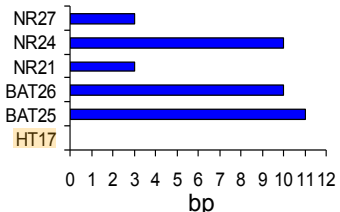
B Stuttering



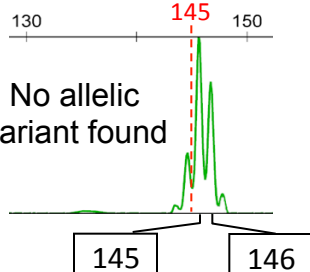
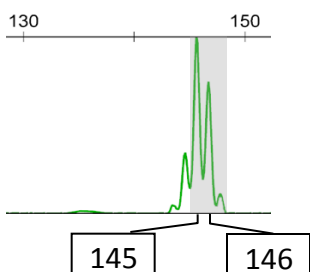
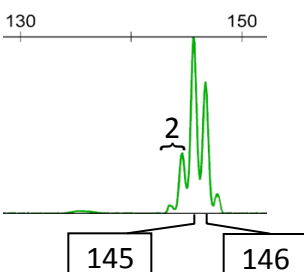
C QMVR



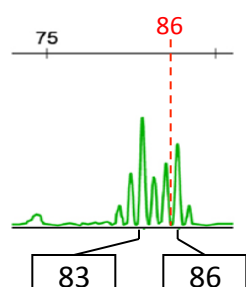
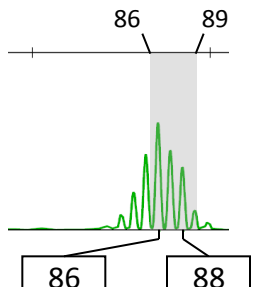
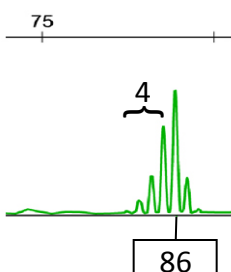
D Allelic Variant Outside QMVR



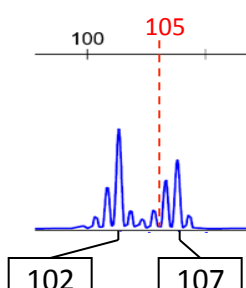
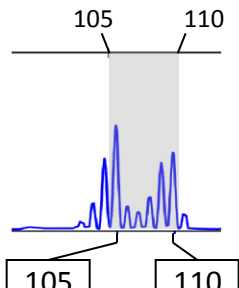
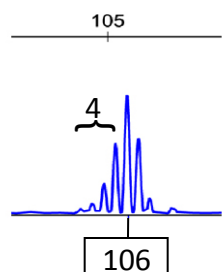
HT17



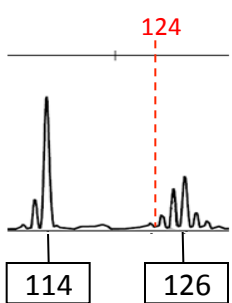
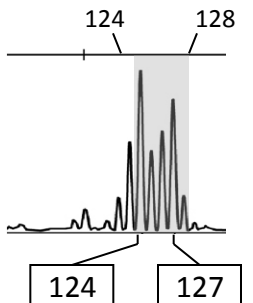
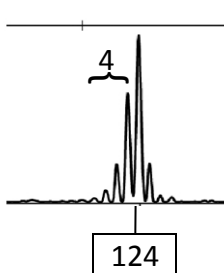
NR27



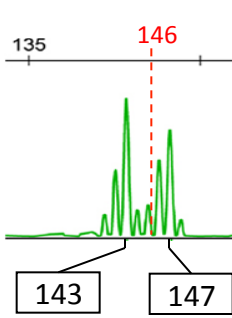
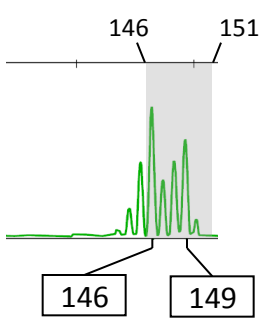
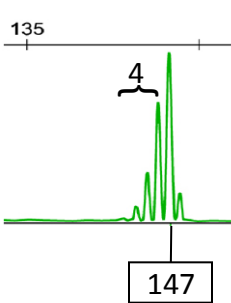
NR21



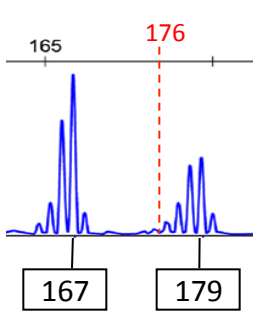
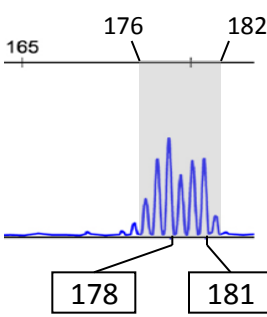
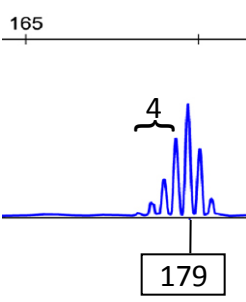
NR24



BAT25

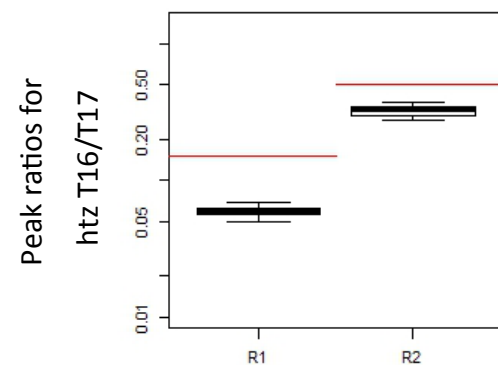
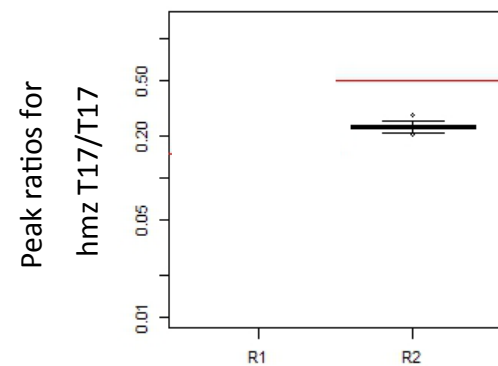
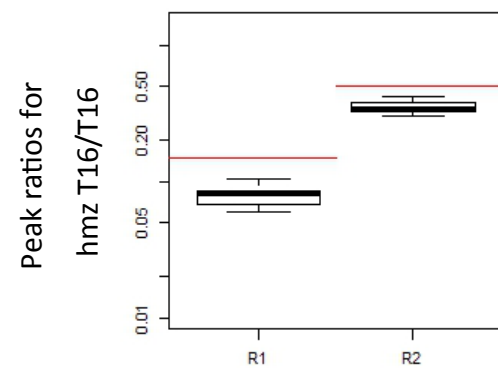


BAT26

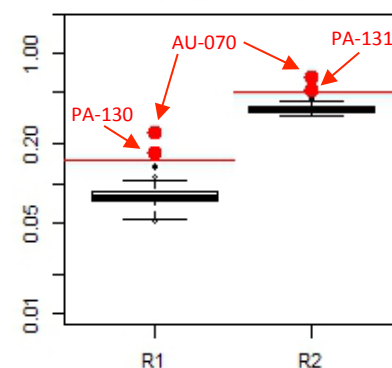
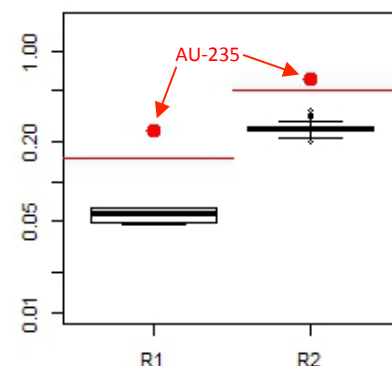
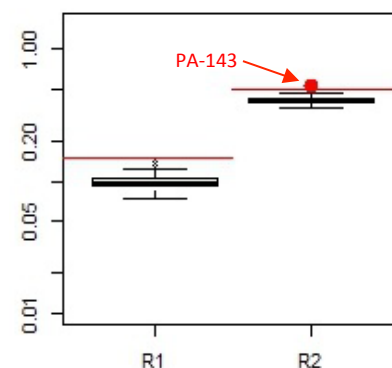


A

Normal cases



MSS

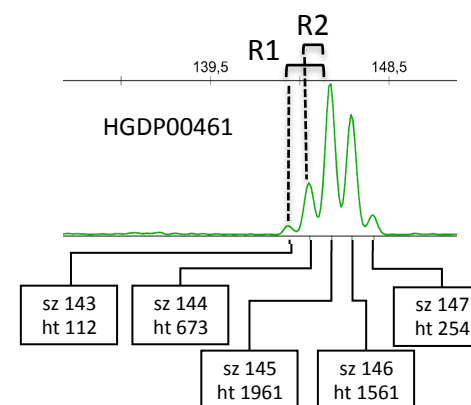


B

Normal Cases

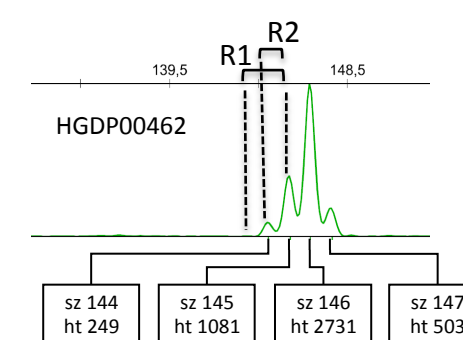
$$R1 \leq 0.15$$

$$R2 \leq 0.5$$



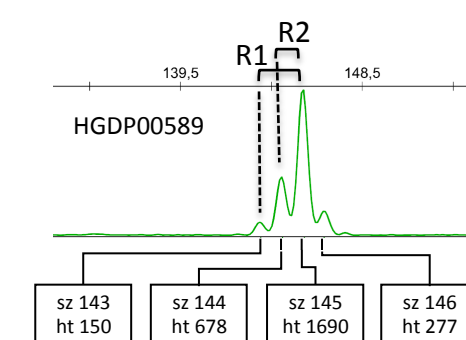
$$R1 = 112/1961 = 0.06$$

$$R2 = 673/1961 = 0.34$$



$$R1 = \text{NA}$$

$$R2 = 249/1081 = 0.23$$



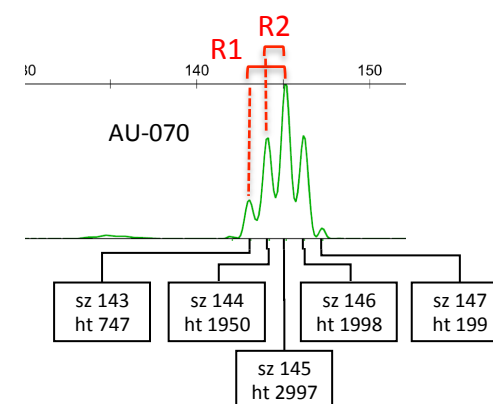
$$R1 = 150/1690 = 0.09$$

$$R2 = 678/1690 = 0.4$$

Aberrant Cases

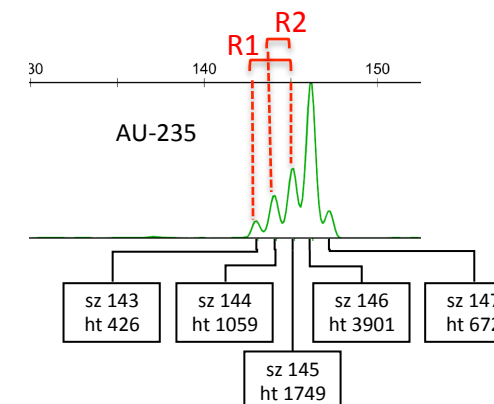
$$R1 > 0.15$$

$$R2 > 0.5$$



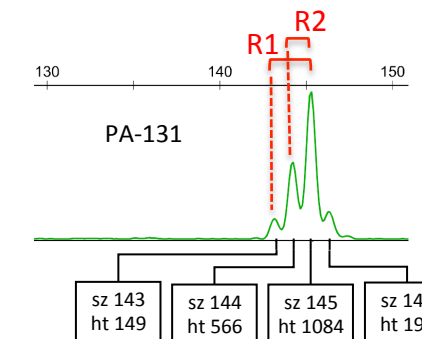
$$R1 = 747/2997 = 0.25$$

$$R2 = 1950/2997 = 0.65$$



$$R1 = 747/2997 = 0.25$$

$$R2 = 1950/2997 = 0.65$$



$$R1 = 149/1084 = 0.14$$

$$R2 = 566/1084 = 0.52$$

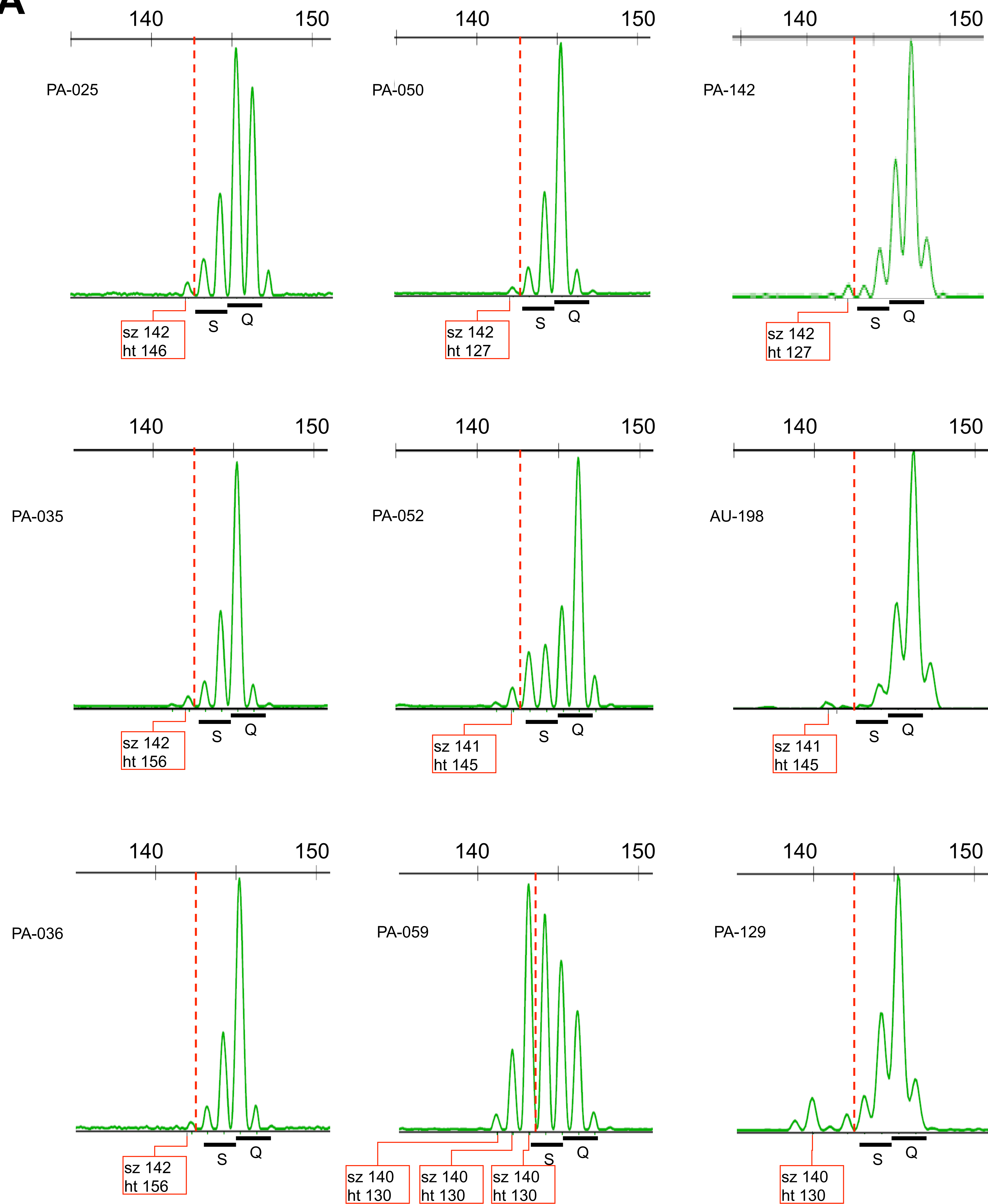
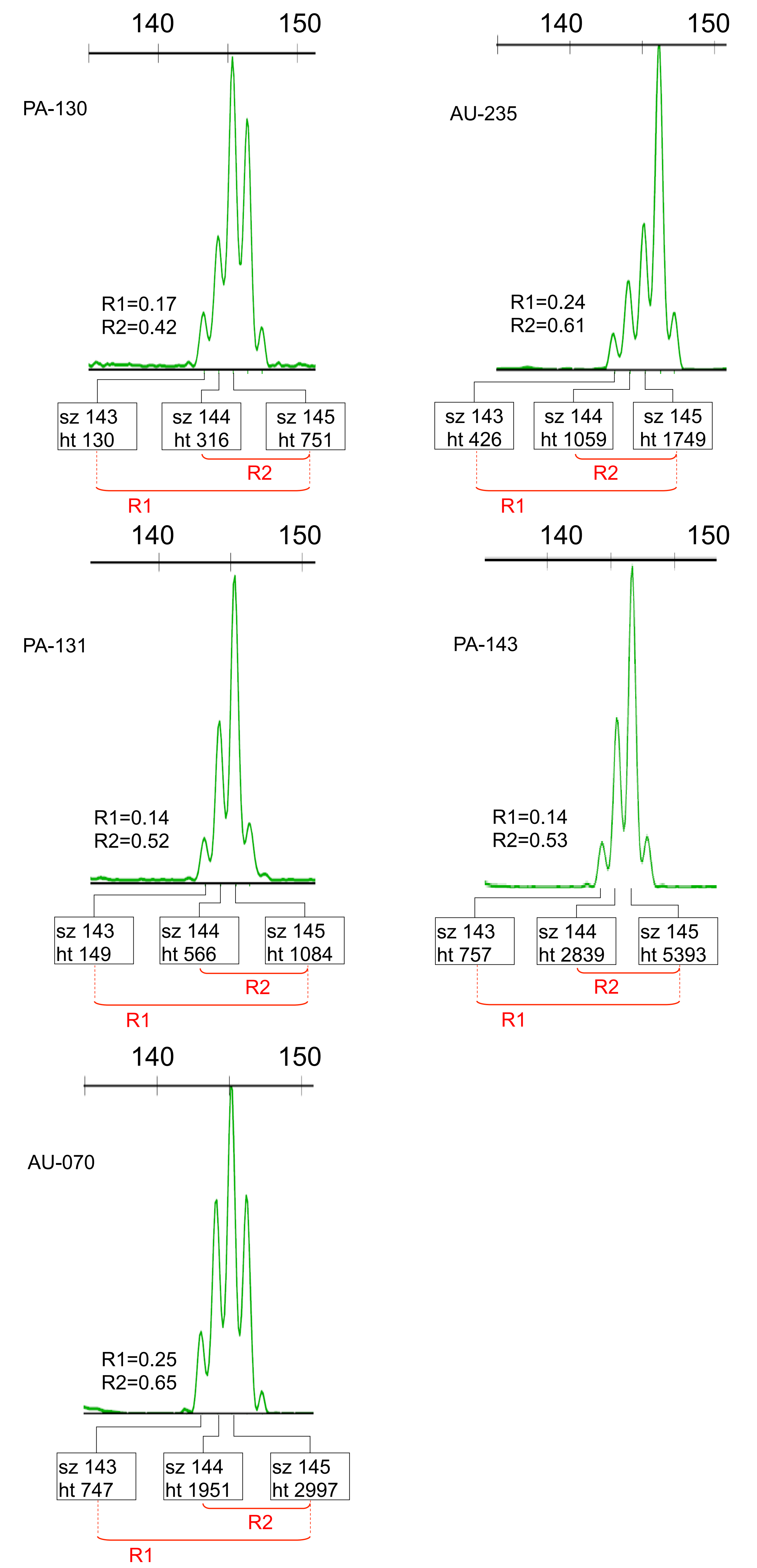
A**B**

Table 1. Distribution of the 4 genotypes identified for HT17 in 1,037 individuals from the worldwide population.

Geographic origin	Region	N of cases	T16/T16	T17/T17	T16/T17	T17/T18
Algeria (Mzab)	North Africa	27	8 (29.6)	7 (25.9)	12 (44.4)	0 (0)
Bougainville	Oceania	12	0 (0)	10 (83.3)	2 (16.7)	0 (0)
Brazil	America	22	0 (0)	21 (95.5)	1 (4.5)	0 (0)
Cambodia	Asia	10	0 (0)	9 (90)	1 (10)	0 (0)
Central African Republic	Subsaharan Africa	26	0 (0)	24 (92.3)	2 (7.7)	0 (0)
Venezuela	America	4	1 (25)	2 (50)	1 (25)	0 (0)
China	Asia	172	1 (0.6)	162 (94.2)	8 (4.7)	1 (0.6)
Colombia	America	7	0 (0)	4 (57.1)	3 (42.9)	0 (0)
Democratic Republic of Congo	Subsaharan Africa	13	0 (0)	11 (84.6)	2 (15.4)	0 (0)
France	Europe	68	18 (26.5)	16 (23.5)	34 (50)	0 (0)
Israel (Carmel)	Middle East	36	4 (11.1)	9 (25)	23 (63.9)	0 (0)
Israel (Central)	Middle East	38	5 (13.2)	15 (39.5)	18 (47.4)	0 (0)
Israel (Negev)	Middle East	41	6 (14.6)	20 (48.8)	15 (36.6)	0 (0)
Italy	Europe	33	10 (30.3)	7 (21.2)	16 (48.5)	0 (0)
Italy (Bergamo)	Europe	12	5 (41.7)	1 (8.3)	6 (50)	0 (0)
Japan	Asia	24	0 (0)	24 (100)	0 (0)	0 (0)
Kenya	Subsaharan Africa	11	0 (0)	9 (81.8)	2 (18.2)	0 (0)
Mexico	America	31	0 (0)	28 (90.3)	3 (9.7)	0 (0)
Namibia	Subsaharan Africa	6	0 (0)	6 (100)	0 (0)	0 (0)
New Guinea	Oceania	16	0 (0)	15 (93.8)	0 (0)	1 (6.3)
Nigeria	Subsaharan Africa	22	0 (0)	12 (54.5)	9 (40.9)	1 (4.5)
North America	America	129	39 (30.2)	32 (24.8)	58 (45)	0 (0)
Orkney Islands	Europe	11	2 (18.2)	3 (27.3)	6 (54.5)	0 (0)
Pakistan	Asia	175	19 (10.9)	100 (57.1)	56 (32)	0 (0)
Russia	Europe	23	7 (30.4)	7 (30.4)	9 (39.1)	0 (0)
Russia Caucasus	Europe	17	3 (17.6)	6 (35.3)	8 (47.1)	0 (0)
Senegal	Subsaharan Africa	22	4 (18.2)	12 (54.5)	6 (27.3)	0 (0)
Siberia	Asia	21	3 (14.3)	18 (85.7)	0 (0)	0 (0)
South Africa	Subsaharan Africa	8	0 (0)	5 (62.5)	3 (37.5)	0 (0)

Table 2. Allelic sizes for each marker.

HT17			NR-27		NR-21		NR-24		BAT-25		BAT-26	
Size in bp	Nb alleles	%	Size in bp	%	Size in bp	%	Size in bp	%	Size in bp	%	Size in bp	%
140	0	-	81	-	100	-	112	-	133	-	164	-
141	0	-	82	-	101	-	113	-	134	-	165	-
142	0	-	83	0.2	102	0.7	114	0.05	135	0.04	166	0.08
143	0	-	84	1.0	103	1.6	115	0.0	136	0.08	167	0.5
144	0	-	85	1.4	104	0.1	116	0.0	137	0.08	168	0.1
145	574	27.8	86	2.8	105	0.5	117	0.0	138	0.0	169	0.1
146	1497	72.1	87	67.2	106	5.3	118	0.0	139	0.0	170	0.0
147	3	0.1	88	26.6	107	51.7	119	0.0	140	0.0	171	0.2
148	0	-	89	0.8	108	33.7	120	0.0	141	0.2	172	0.2
149	0	-	90	-	109	6.0	121	0.0	142	0.2	173	0.0
			91	-	110	0.2	122	0.0	143	0.4	174	0.0
					111	0.2	123	0.0	144	0.5	175	0.0
					112	-	124	0.4	145	0.2	176	0.08
					113	-	125	27.2	146	1.4	177	1.2
							126	68.9	147	13.7	178	14.5
							127	3.2	148	49.5	179	65.5
							128	0.2	149	27.4	180	15.2
							129	0.0	150	5.5	181	2.3
							130	0.05	151	0.8	182	0.04
							131	-	152	-	183	-
							132	-	153	-	184	-

Allelic sizes were measured from the entire worldwide germline DNA series. For each marker, alleles in the quasi-monomorphic variation ranges (QMVR) are boxed in dark gray cells while polymorphic alleles are in light gray cells.

Table 3. Analysis of samples with discordant or doubtful HT17/pentaplex profiles and assessment of their MSI status.

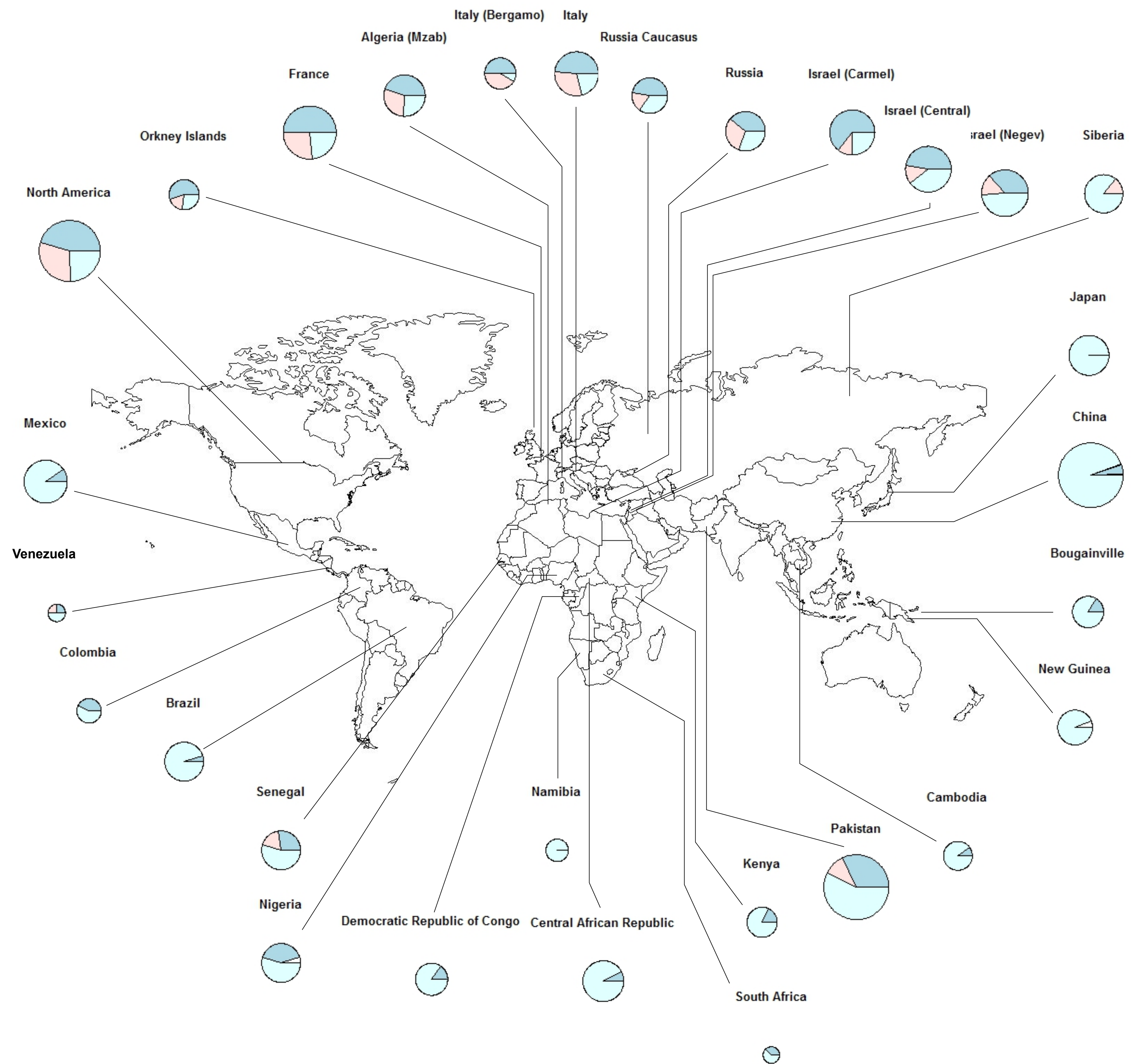
[illegible]

Table 4. Sensitivities, specificities and positive and negative predictive values for the determination of MSI by pentaplex markers and by HT17. *

Pentaplex cut-off [†]	Model estimator	Markers	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
cut-off = 2						
	Hasting-Metropolis					
		Pentaplex	0.95 (0.93-0.97)	1.00 (0.99-1.00)	1.00 (1.00-1.00)	0.96 (0.96-0.96)
		HT17	0.98 (0.97-0.99)	1.00 (0.99-1.00)	1.00 (1.00-1.00)	0.99 (0.98-0.99)
	Expectation-maximization					
		Pentaplex	0.94	1	1	0.94
		HT17	0.99	1	1	0.99
cut-off = 3						
	Hasting-Metropolis					
		Pentaplex	0.93 (0.90-0.96)	1.00 (0.99-1.00)	1.00 (1.00-1.00)	0.95 (0.95-0.95)
		HT17	0.99 (0.98-1.00)	1.00 (0.99-1.00)	1.00 (1.00-1.00)	0.99 (0.99-0.99)
	Expectation-maximization					
		Pentaplex	0.94	1	1	0.94
		HT17	0.99	1	1	0.99

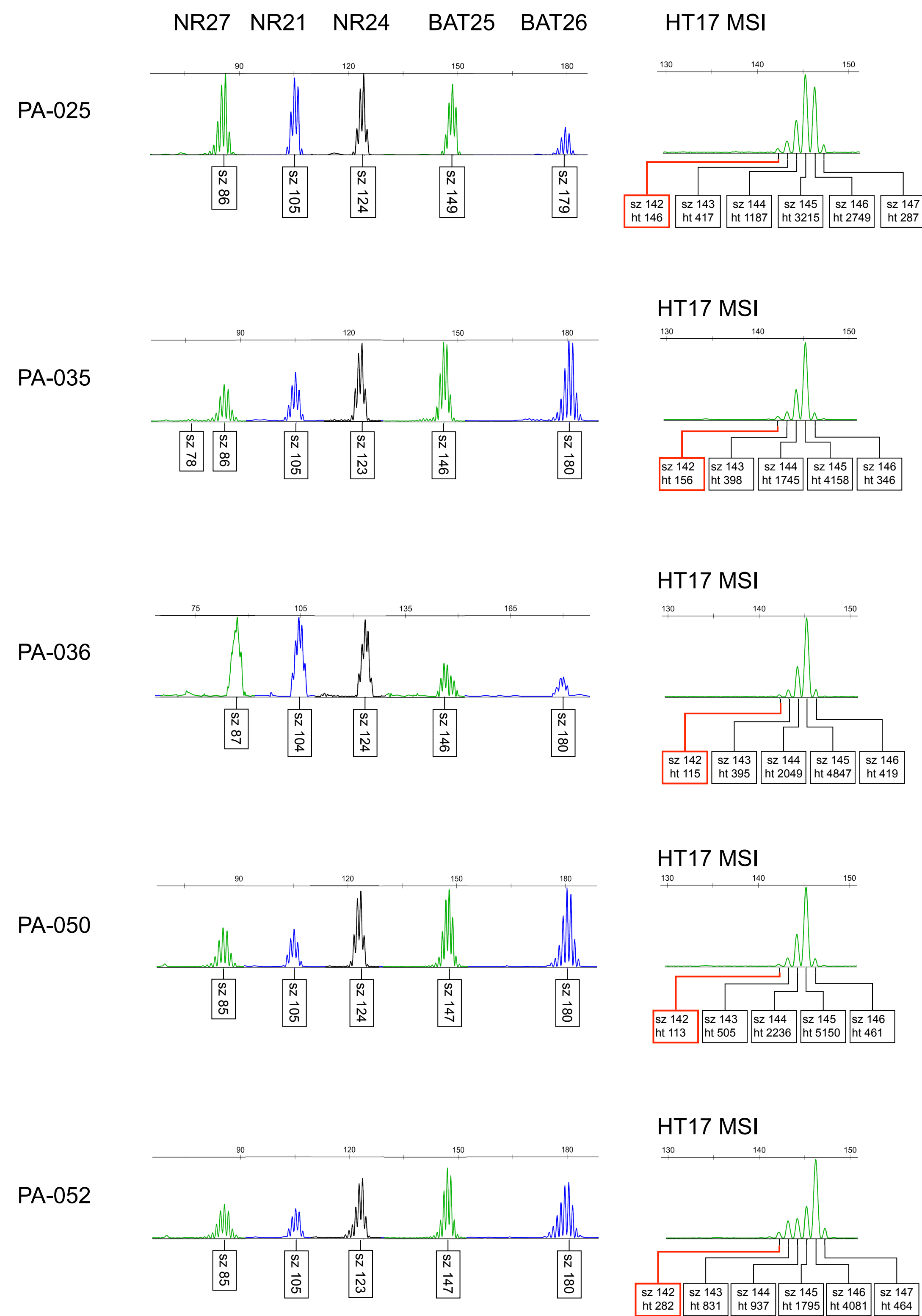
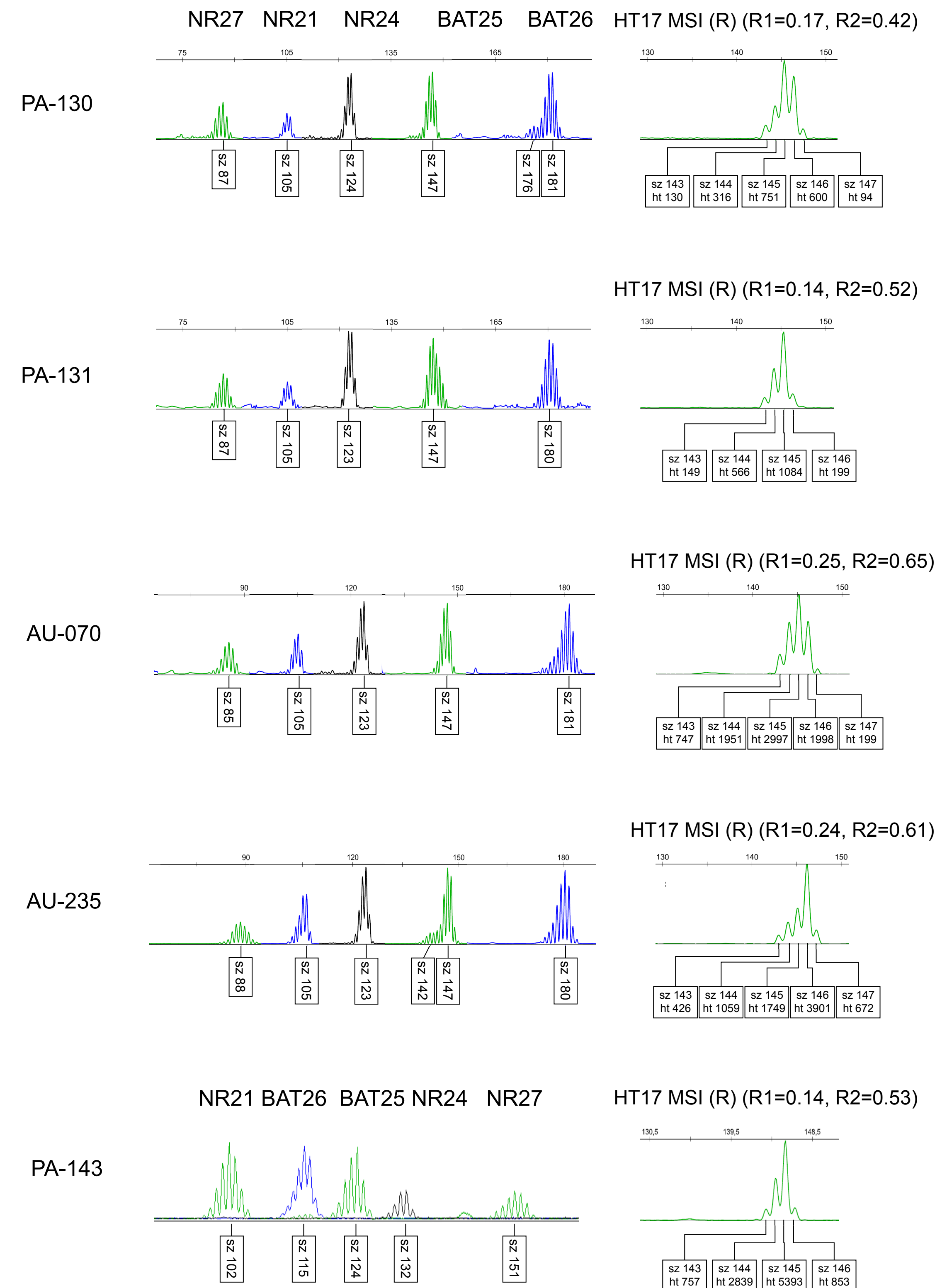
* CI denotes confidence interval.

[†] Indicates the number of unstable markers that were used as a cut-off to define tumor samples as MSI with the pentaplex method.

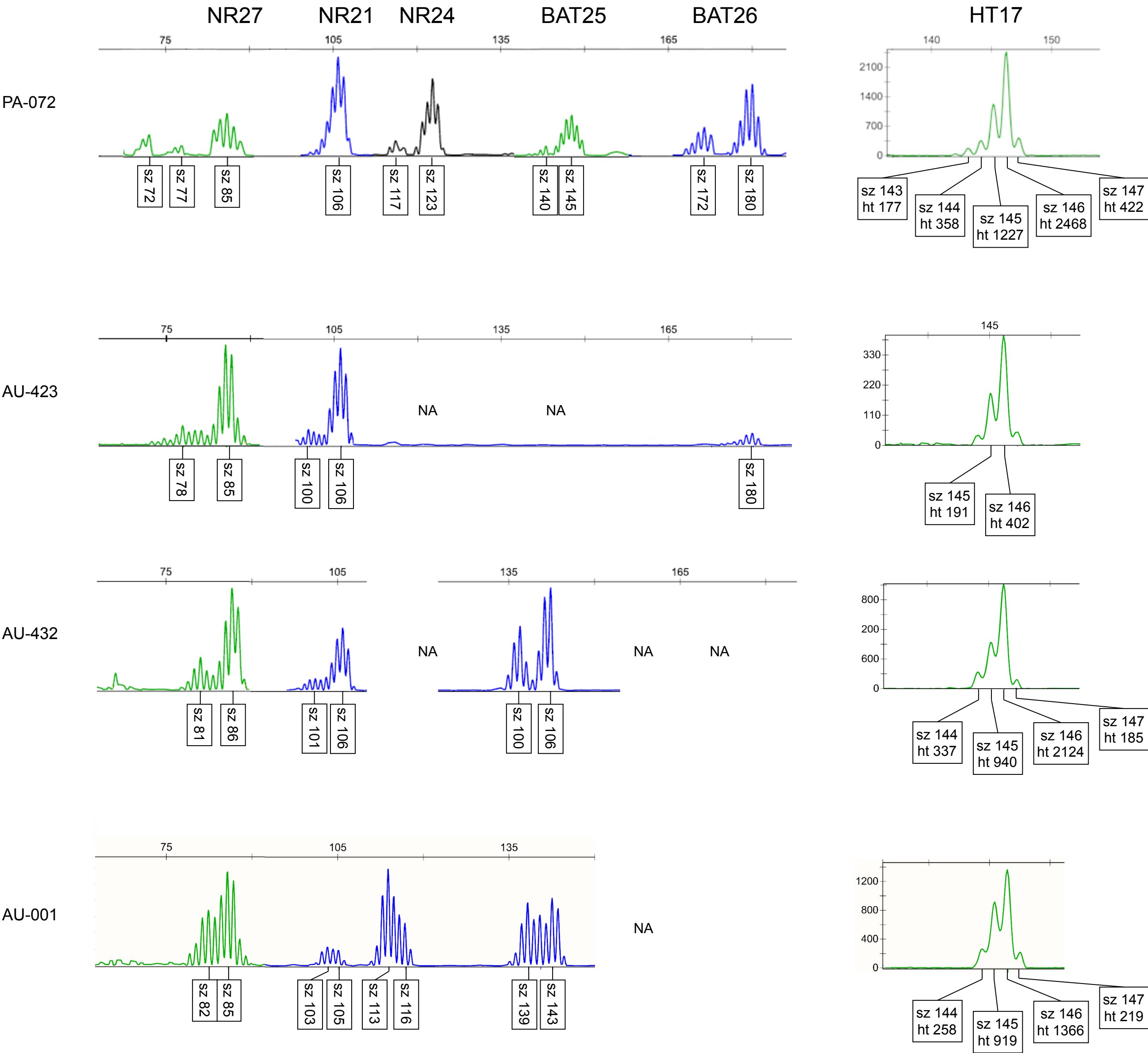


Supplementary Figure S1:

Worldwide distribution of the 3 main HT17 genotypes according to the geographic origin of the HGDP/CEPH panel. The genotypes are annotated as follows: homozygous T16 (orange), homozygous T17 (light blue), heterozygous T16/T17 (dark blue). Sizes of pie charts are proportional to the number of individuals in each case. Genotypes were not uniformly distributed according to a north-south gradient of the T16 allele.

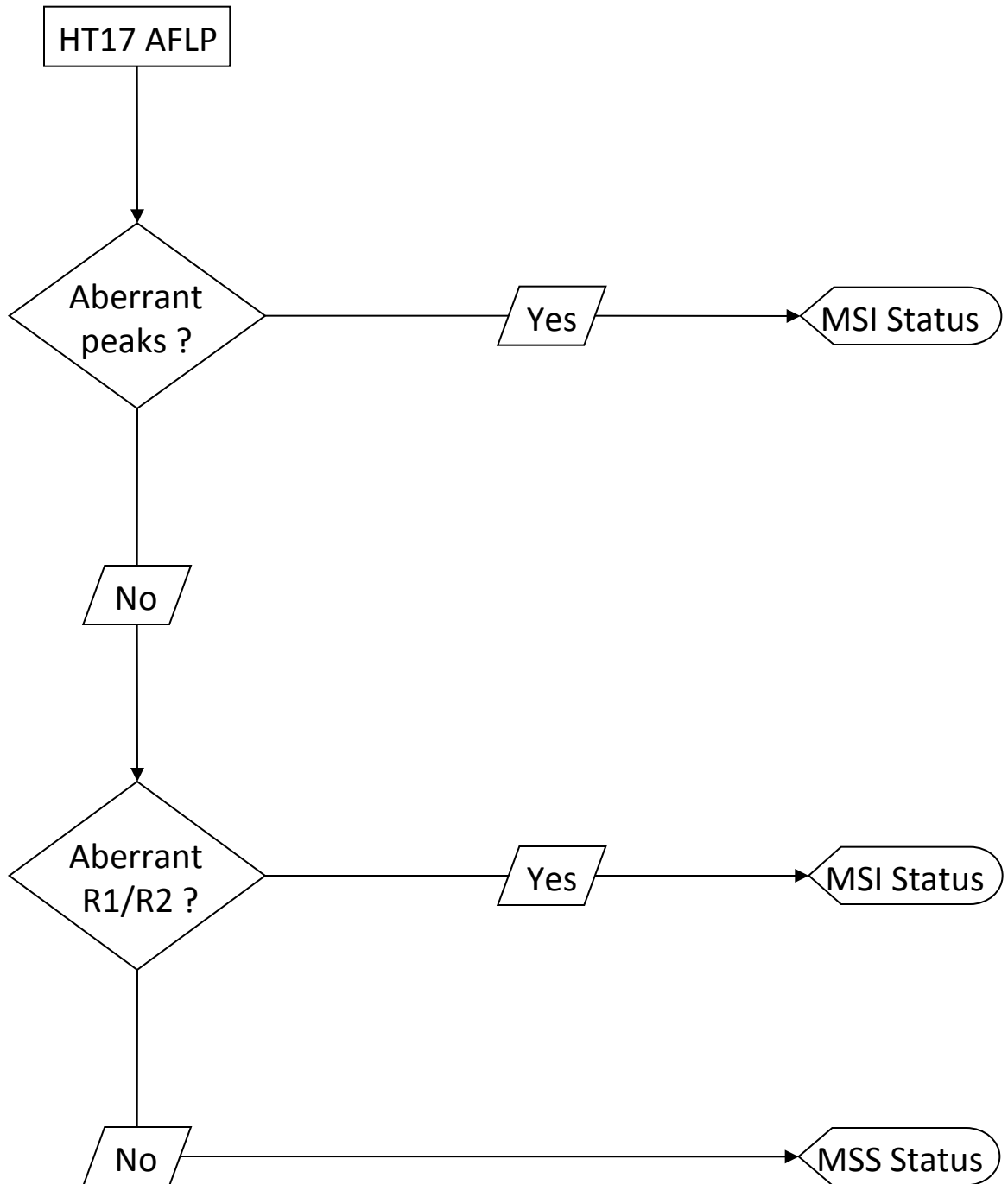
A**B****Supplementary Figure S2:**

Traces of pentaplex and HT17 markers for the 14 false negative pentaplex cases. **A:** 9 cases displaying aberrant HT17 peaks (in red). **B:** 5 cases displaying aberrant R1 (> 0.15) and/or R2 (> 0.5) HT17 ratios. Sz: size of the amplicon in base pairs. Ht : peaks height (arbitrary units).



Supplementary Figure S3:

Traces of the pentaplex and HT17 markers for the 4 false negative HT17 cases. The sz annotation indicates the size of the amplicon in base pairs, and the ht annotation reports the height of the peak measured as an arbitrary fluorescent unit (AFU).



EDITORIAL 1

**Microsatellite Instability in colorectal cancer : Time to stop
Hiding !**

Oncotarget (2011)

Microsatellite Instability in Colorectal Cancer: Time to Stop Hiding!

Alex Duval, Ada Collura, Kevin Berthenet, Anaïs Lagrange, Carmen Garrido

Colorectal cancer (CRC) is the second cause of cancer-related death worldwide. Surgery constitutes the primary therapy for these tumors, together with chemotherapy that is usually recommended in patients with metastatic primary CRC. Although molecularly distinct entities arising from different physiopathogenic mechanisms - microsatellite (MSI) and chromosomal instability (also called microsatellite stable, MSS) - have been characterized in CRC, there is still no specific therapeutic approach that takes into account disease's molecular heterogeneity [1]. MSI is observed in 10-15% of sporadic CRCs. MSI CRCs displayed particular morphologic features, with greater predilection for the right colon, mucinous histology, low metastatic power, poorer differentiation and higher numbers of tumor-infiltrating lymphocytes. They have been consistently reported to show an improved prognosis and a different response to chemotherapeutic agents. In a recent article in *Nature Medicine*, we have reported the specific mutation of the molecular chaperone HSP110 in MSI CRCs and how the presence of this mutant may constitute a first step towards the understanding of their particular clinical characteristics [2].

It is now well established that MMR deficiency is not in itself a direct transforming event and that the development of these tumors is MSI-driven. This distinctive MSI pathway is characterized by somatic mutational events affecting short coding repeated sequences that, when having an oncogenic effect, provide selective pressure during tumor progression [3]. We showed that a T₁₇ mononucleotide repeat located in intron 8 of *HSP110* was systematically mutated in MSI CRC cell lines and primary tumors [2]. The shortening of this repeat in tumor DNA correlated with increased synthesis of an aberrant *HSP110* transcript due to exon 9 skipping, to the detriment of wild-type *HSP110* mRNA. As a result, a truncated HSP110 mutant protein (HSP110DE9) accumulated in MSI tumors. Strikingly, we demonstrated that HSP110DE9 acts as a dominant negative mutant that binds to HSP110 abrogating its chaperone activity and cytoprotective function. In colon tumors, HSPs including HSP110 have been clearly shown to promote cancer cell survival, protecting oncogenic proteins and inhibiting apoptosis [4-6]. It is thus unclear why HSP110DE9 proapoptotic mutant is selected during MSI tumorigenesis. Long, noncoding mononucleotide repeats

such as the T₁₇ located in *HSP110* intron 8 constitute hot spots for mutations in MSI tumors due to the MMR deficiency. Our hypothesis is that when these mutations are endowed with a biological anti-cancer activity, as it is the case with HSP110DE9, they can represent an Achilles' heel in the MSI-driven tumorigenic process. Further studies are now necessary to determine the exact role of HSP110DE9 during MSI tumor progression and to understand the contribution of HSP110DE9 in the more favorable prognosis of CRC MSI compared to MSS patients.

In vitro, HSP110DE9 expression sensitized colon cancer cells to anticancer agents such as oxaliplatin and 5-fluorouracil, which are routinely prescribed in the adjuvant treatment of patients with CRC [7]. In line with these results, we observed that MSI CRC patients with high HSP110DE9 expression levels who received chemotherapy were all associated with disease-free survival [2]. Therefore, HSP110DE9 levels are likely to constitute a crucial determinant for MSI CRC patients' prognosis and treatment response. Because this mutant protein was expressed at variable levels in these tumors, our findings thus provide evidence for an additional layer of clinical heterogeneity among MSI colon cancers. Additional studies in larger populations are now being performed in order to confirm these results. MSI CRC patients have been recurrently reported to benefit less from 5-FU treatment whereas they seem to show improved response to 5-FU-oxaliplatin (FOLFOX) that constitute today the gold standard of adjuvant chemotherapy in CRC. As Dr. Andrew T. Chan mentions in a recent issue in *Nature Medicine* [8], "it is fascinating to speculate that such studies might show a lack of response to 5-FU confined to the MSI CRCs with low levels of HSP110DE9".

In tumor samples, MSI phenotype can be determined by PCR according to international criteria or by immunohistochemistry studying mismatch repair (MMR) protein expression affecting MLH1, MSH2, MSH6 or PMS2. Our findings highlight that routine evaluation of the MSI phenotype together with investigation of HSP110 status could be of clinical interest in CRC diagnosis. Note worthily, HSP110DE9 is the first HSP mutant identified in a cancer so far. Developing inhibitors of HSP110 that mimic the anti-cancer chemosensitizing effect of HSP110DE9 is also a promising perspective.

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe 'Instabilité des Microsatellites et Cancers', Paris, France:
Alex Duval, Ada Collura, Anaïs Lagrange
Université Pierre et Marie Curie Paris, France: Alex Duval,
Ada Collura, Anaïs Lagrange
INSERM, Dijon, France: Kevin Berthenet, Carmen Garrido
University of Burgundy, Dijon, France: Kevin Berthenet,
Carmen Garrido
CHU Dijon, France: Carmen Garrido

Email: Alex.Duval@inserm.fr

Received: November 10, 2011;

Published: November 12, 2011;

REFERENCES

1. Hamelin R, Chalastanis A, Colas C, et al. Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers. *Bulletin du cancer*. 2008; 95: 121-132.
2. Dorard C, de Thonel A, Collura A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nature medicine*. 2011; 17: 1283-1289.
3. Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer research*. 2002; 62: 2447-2454.
4. Jego G, Hazoume A, Seigneuric R, et al. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer letters*. published online, doi:10.1016/j.canlet.2010.10.014 (13 November 2010).
5. Kai M, Nakatsura T, Egami H, et al. Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncology reports*. 2003; 10: 1777-1782.
6. Slaby O, Sobkova K, Svoboda M, et al. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncology reports*. 2009; 21: 1235-1241.
7. Zaanen A, Cuilliere-Dartigues P, Guilloux A, et al. Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann Oncol*. 2010; 21: 772-780.
8. Chan AT. Turning up the heat on colorectal cancer. *Nature medicine*. 2011; 17: 1186-1188.

EDITORIAL 2

Mutation d'HSP110 dans les cancers colorectaux. Le paradoxe du chaperon qui ne protège plus.

Médecine et Science (2012)



Mutation d'HSP110 dans les cancers colorectaux

Le paradoxe du chaperon qui ne protège plus

Carmen Garrido^{1,2}, Ada Collura^{3,4}, Kevin Berthenet^{1,2}, Anaïs Lagrange^{3,4}, Alex Duval^{3,4}

¹ Inserm, UMRS 866, 21033 Dijon, France ;

² université de Bourgogne, esplanade Érasme, 21078 Dijon, France ;

³ Inserm, UMRS 938 – centre de recherche Saint-Antoine, équipe instabilité des microsatellites et cancers, 75012, Paris, France ;

⁴ université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France.

alex.duval@inserm.fr

cgarrido@u-bourgogne.fr

Mutation de HSP110 dans les cancers colorectaux

Les protéines chaperons ou HSP (*heat shock proteins*) sont essentielles à la cellule. Elles se comportent comme des chaperons ou « capuchons moléculaires » pour d'autres protéines cellulaires, intervenant ainsi dans de nombreux processus biologiques. Chez les mammifères, il existe cinq principales familles de protéines HSP, classées en fonction de leurs poids moléculaires (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 et les petites HSP) (pour revue, voir [1]).

Certaines de ces protéines HSP sont surexprimées par les cellules tumorales, ce qui leur permet ainsi de s'adapter aux conditions environnementales qu'elles ont à affronter au cours du développement du cancer chez le patient ; l'expression accrue de ces HSP protège par exemple les cellules tumorales de la mort cellulaire, notamment celle qu'induisent les drogues utilisées lors du traitement des patients par chimiothérapie. Plusieurs inhibiteurs de protéines chaperons pourraient être inclus dans l'arsenal thérapeutique anticancéreux et sont actuellement testés dans des essais cliniques chez l'homme.

En collaboration avec l'équipe de Carmen Garrido, l'équipe d'Alex Duval a identifié la mutation d'un des gènes de la superfamille des HSP, le gène *HSP110*, dans des cancers colorectaux [2]. La protéine mutante perd plusieurs domaines protéiques essentiels à son activité. Elle

se lie à la protéine HSP110 normale et l'empêche par là même de jouer son rôle de chaperon dans la cellule. Les cellules tumorales exprimant la protéine mutante sont fragilisées et montrent en particulier une sensibilité accrue aux chimiothérapies prescrites aujourd'hui dans le traitement des patients atteints de cancer du côlon, comme le 5-fluorouracile ou l'oxaliplatine. La protéine mutante est délocalisée dans le cytoplasme, contrairement à la protéine HSP110 sauvage dont la localisation est à la fois cytoplasmique et membranaire (Figure 1).

Mutation de HSP110 : un marqueur prédictif de la réponse thérapeutique

Sur un plan clinique, nous avons observé que la protéine mutante était présente

à des taux variables chez 100 % des patients qui souffraient d'une forme particulière de cancer colorectal (CCR). Il s'agit des tumeurs du côlon appelées MSI (pour *microsatellite instability*), qui représentent 20 % environ de l'ensemble des CCR chez l'homme. De manière parfaitement concordante avec les résultats acquis *in vitro* dans des cultures de cellules tumorales, nous avons observé que les patients dont les tumeurs expriment fortement la protéine mutante (35 % des malades porteurs d'un CCR MSI environ) répondent très favorablement à la chimiothérapie puisqu'aucune rechute de la maladie n'est observée chez eux. À l'inverse, les patients qui expriment la protéine mutante à des taux plus

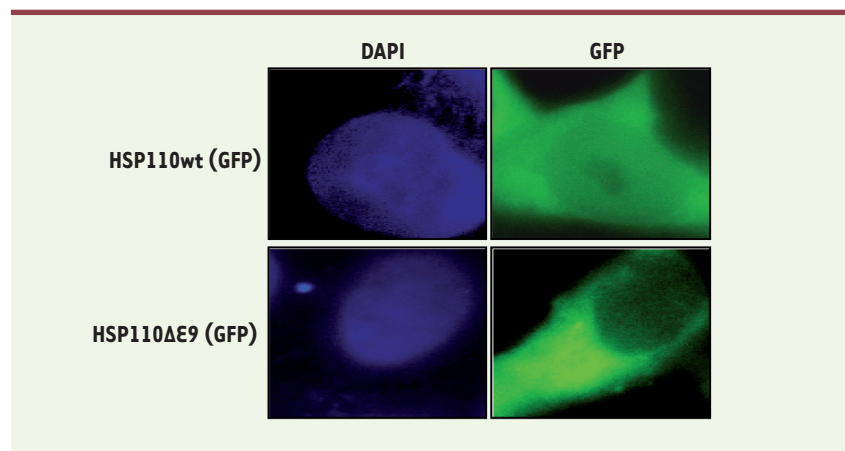


Figure 1. Expression de la protéine chaperon HSP110 dans la cellule tumorale colique. La protéine sauvage (Hsp110wt) présente une expression nucléaire et cytoplasmique. La protéine mutante (HSP110ΔE9) présente une expression aberrante, restreinte au cytoplasme. GFP : green fluorescent protein ; DAPI : marqueur des noyaux.

faibles (65 % des patients porteurs d'un CCR MSI) répondent moins favorablement au traitement et leur maladie récidive. Ces derniers résultats sont particulièrement intéressants sur le plan clinique ; ils attestent en effet que la connaissance du statut dans la tumeur de la protéine HSP110 (forte ou faible expression) permet de prédire la réponse au traitement du patient. Celle-ci étant facilement déterminée en clinique, la prise en charge thérapeutique devrait donc être améliorée. C'est d'autant plus important que le cancer du côlon, un des cancers les plus fréquents dans le monde, représente la deuxième cause de mortalité par cancer chez l'homme, et que les patients bénéficiant d'une chimiothérapie sont ceux qui souffrent d'une forme grave et malheureusement fréquente de la maladie (tumeur invasive associée à des métastases loco-régionales, au niveau ganglionnaire) [3]. À plus long terme, la découverte de nouveaux composés qui seraient

capables de mimer l'effet chimiosensibilisant de la protéine HSP110 mutante dans la cellule cancéreuse constituerait une avancée significative dans le traitement du cancer.

Une mutation inattendue dans un contexte tumoral

Les cellules tumorales MSI [4-6] présentent un phénotype d'instabilité génomique particulier, consécutif au défaut fonctionnel du système MMR (*mismatch repair*), qui se caractérise par l'accumulation de nombreuses altérations dans les séquences répétées du génome, ou microsatellites [7, 8]. Il semble que le défaut d'expression du gène *HSP110* dans ces tumeurs est consécutif à l'instabilité d'une séquence microsatellite de grande taille (répétition T_{17}), localisée dans un intron et dont la mutation provoque un épissage aberrant par saut de l'exon 9 [2]. L'expression d'une protéine mutante comme la protéine HSP110 $\Delta E9$ est un événement *a priori* surprenant

puisque son action est délétère pour les cellules tumorales (rôle proapoptotique, effet chimiosensibilisant). Notre hypothèse pour expliquer la survenue fréquente d'un tel événement dans le cancer est que le mécanisme qui en est à l'origine, la délétion du microsatellite intronique T_{17} , est probablement inévitable dans des cellules tumorales déficientes en MMR. En effet, ces clones déficients en MMR, dont l'index mitotique est souvent très élevé, ne sont pas en mesure de réparer les erreurs de réplication qui surviennent inéluctablement et à haute fréquence au niveau de telles répétitions génomiques intro-niques de grande taille. Cette hypothèse demande à être confirmée afin de percer le mystère de l'expression paradoxale du chaperon qui ne protège plus. ♦

Mutation of HSP110 in colorectal cancer: the chaperone paradox

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Lanneau D, Wettstein G, Bonniaud P, Garrido C. Heat shock proteins : cell protection through protein triage. *Scientific World Journal* 2010 ; 10 : 1543-52.
2. Dorard C, de Thonel A, Collura A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 2011 ; 17 : 1283-9.
3. Zaanani A, Cuillière-Dartigues P, Guilloux A, et al. Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann Oncol* 2010 ; 21 : 772-80.
4. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993 ; 260 : 816-9.
5. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993 ; 363 : 558-61.
6. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993 ; 260 : 812-6.
7. Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers : toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002 ; 62 : 2447-54.
8. Duval A, Hamelin R. Réparation des erreurs de réplication, microsatellites et cancer. *Med Sci (Paris)* 2003 ; 19 : 55-62.

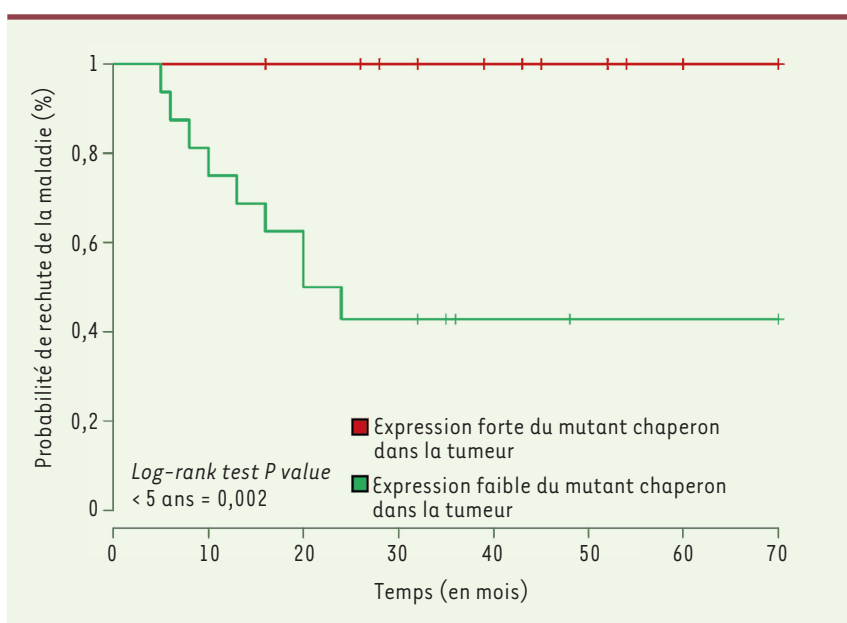


Figure 2. Impact de l'expression du mutant chaperon HSP110 $\Delta E9$ dans la tumeur sur la réponse à la chimiothérapie des patients atteints de CCR MSI. L'expression forte du mutant HSP110 $\Delta E9$ dans la tumeur protège d'une rechute de la maladie après traitement par chimiothérapie.

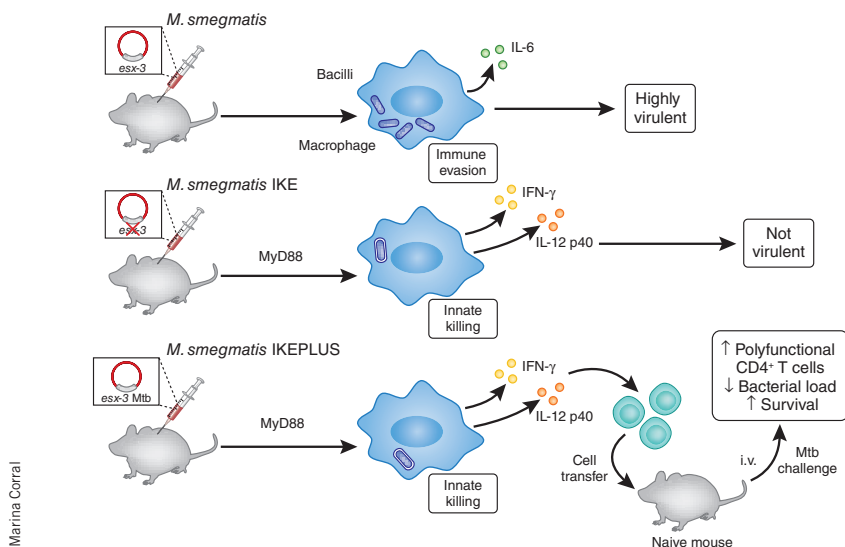


Figure 1 A vaccine candidate induces sterilizing immunity against *M. tuberculosis*. High-dose intravenous *M. smegmatis* is highly virulent in mice. Sweeney *et al.*³ show that deletion of the ESX-3 secretion system (IKE strain) leads to a MyD88-dependent T_H1 immune response and an attenuated phenotype. Complementation of the IKE strain with *esx-3* from *M. tuberculosis* (Mtb) (IKEPLUS strain) does not restore the virulent phenotype but leads to a vaccine candidate that induces a potent T_H1 immune response, clearance of bacteria and survival. Adoptive transfer of $CD4^+$ T cells from IKEPLUS-vaccinated mice is also highly efficacious against *M. tuberculosis* challenge, and this efficacy is associated with an increased number of polyfunctional $CD4^+$ T cells in the lungs after challenge. IFN- γ , interferon- γ .

and this effect is independent of interleukin-1 (IL-1) and Toll-like receptor 2. Further research will need to clarify the precise molecular interactions of the ESX-3 system and exactly how this secretion system allows evasion of the innate immune response.

It is increasingly clear that the early innate immune response induced soon after vaccination is important in shaping the subsequent adaptive immune response¹⁰. The study by Sweeney *et al.*³ shows that the loss of innate immune evasion genes led to a modified innate immune response, with increased concentration

of IL-12 and reduced concentration of IL-6, which led to a quantitatively and qualitatively improved adaptive T_H1 immune response, with an enhanced interferon- γ response and increased numbers of polyfunctional $CD4^+$ T cells. Although there is conflicting evidence for the importance of polyfunctional $CD4^+$ T cells in protection^{11,12}, the association shown here in mice further supports their relevance in providing protection against mycobacteria³.

Further work is needed to evaluate this vaccine construct in models that more closely resemble the human response to mycobacterial

infection, such as guinea pigs and nonhuman primates. If these studies confirm the results seen here, optimization of the IKEPLUS construct will be required to meet regulatory requirements for safety¹³ before this vaccine can be evaluated in humans.

The study by Sweeney *et al.*³ illustrates the power of serendipity in science. Experiments initially designed to understand the function of the mycobacterial ESX system have led to the identification of a potential new vaccine candidate. Only careful clinical testing for safety, immunogenicity and, ultimately, efficacy will tell us whether the data shown here will yield a vaccine that will have an impact on the global tuberculosis burden. Nevertheless, this paper poses an important new development and a very promising first step. Furthermore, the demonstration that sterilizing immunity is achievable sets a new level of expectation of what might be possible. The bar just went up.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

1. World Health Organization. WHO declares tuberculosis a global emergency (press release). **WHO/31.4-23-1993** (1993).
2. World Health Organization. Global tuberculosis control 2010. <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf> (2010).
3. Sweeney, K.A. *et al.* *Nat. Med.* **17**, 1261–1268 (2011).
4. Trunz, B.B., Fine, P. & Dye, C. *Lancet* **367**, 1173–1180 (2006).
5. Aagaard, C. *et al.* *Nat. Med.* **17**, 189–194 (2011).
6. McShane, H. *et al.* *Nat. Med.* **10**, 1240–1244 (2004).
7. Grode, L. *et al.* *J. Clin. Invest.* **115**, 2472–2479 (2005).
8. Martin, C. *et al.* *Vaccine* **24**, 3408–3419 (2006).
9. Russell, D.G. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 39–47 (2007).
10. Querec, T.D. *et al.* *Nat. Immunol.* **10**, 116–125 (2009).
11. Derrick, S.C., Yabe, I.M., Yang, A. & Morris, S.L. *Vaccine* **29**, 2902–2909 (2011).
12. Kagina, B.M. *et al.* *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 1073–1079 (2010).
13. Walker, K.B. *et al.* *Vaccine* **28**, 2259–2270 (2010).

Turning up the heat on colorectal cancer

Andrew T Chan

Mutations in the microsatellite of the chaperone heat shock protein 110 (HSP110) yield a mutant protein that counteracts oncogenic potential, enhances responsiveness to chemotherapy and associates with increased survival in individuals with colorectal cancers that arise through defective DNA mismatch repair (pages 1283–1289).

The advent of molecularly targeted therapy for individuals with cancer has been a spectacular achievement, a product of decades of work in

unraveling the molecular basis of many tumors. Colorectal cancer (CRC), as one of the early successes of this effort, was arguably the first solid tumor in which molecularly distinct entities arising from completely unique pathogenic mechanisms—chromosomal or microsatellite instability (MSI)—were clearly characterized¹. Surprisingly, we have not yet been able to fully

exploit this understanding of CRC's molecular heterogeneity to develop robust prognostic biomarkers or treatment strategies tailored for these defined subtypes.

The majority (85%) of sporadic CRCs arise through chromosomal instability, typified by a well-characterized, multistep sequence of genetic alterations. In contrast, about 15% of

Andrew T. Chan is in the Division of Gastroenterology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.
e-mail: achan@partners.org

sporadic CRCs originate from deficient DNA mismatch repair resulting from transcriptional silencing of mismatch repair genes¹. The characteristic mutational signature of tumors that develop through this pathway is MSI, the expansion or contraction of short, repetitive DNA sequences found throughout the genome. MSI CRCs possess distinctive pathological features, with greater predilection for the right colon, poorer differentiation, mucinous histology and higher numbers of tumor-infiltrating lymphocytes¹.

Consistent evidence has shown that people with sporadic MSI CRCs seem to enjoy modestly improved, stage-independent survival compared with individuals with microsatellite-stable (MSS) CRCs that arise through chromosomal instability^{2–5}. And although data also suggest that people with sporadic MSI tumors do not seem to benefit from 5-fluorouracil (5-FU) chemotherapy, a standard approach for adjuvant treatment of CRC^{2,3,5}, not all studies agree^{6,7}.

In this issue of *Nature Medicine*, Dorard *et al.*⁸ provide intriguing new evidence that a previously unknown mutation in the gene encoding HSP110 is linked to increased survival and better treatment response in MSI CRC tumors, antagonizing the oncogenic role of wild-type HSP110 in these cancers. The variable levels of the mutant protein across MSI CRC cell lines and tumor samples may explain differential responses to therapy. This mutant HSP110 may therefore be a functionally important molecular event unique to MSI CRCs, holding promise as a biomarker or new therapeutic target specific for this class of tumors.

Although defective mismatch repair is the well-established mechanism by which MSI tumors develop, the precise downstream events that functionally explain differences in the clinical behavior of MSI cancers remain unclear. Dorard *et al.*⁸ identify a new mutation in the *HSP110* T₁₇ intronic microsatellite universally present in MSI CRCs, resulting in *HSP110* exon 9 skipping and expression of a truncated protein, HSP110ΔE9. HSPs function as molecular chaperones, playing a crucial part in cell survival.

In cancers, HSPs seem to promote the survival of malignant cells, protecting oncogenic proteins from degradation and suppressing apoptosis⁹. The expression of wild-type HSPs in various tumors has been correlated with tumor growth, invasiveness and metastasis (Fig. 1)¹⁰. In contrast, in the study by Dorard *et al.*⁸, the mutant HSP110ΔE9, which lacks a substrate binding domain, failed to show chaperone activities and antiapoptosis properties. Moreover, HSP110ΔE9 abrogated the proneoplastic effects of wild-type HSP110 (HSP110wt) and sensitized MSI CRC cells to treatment with

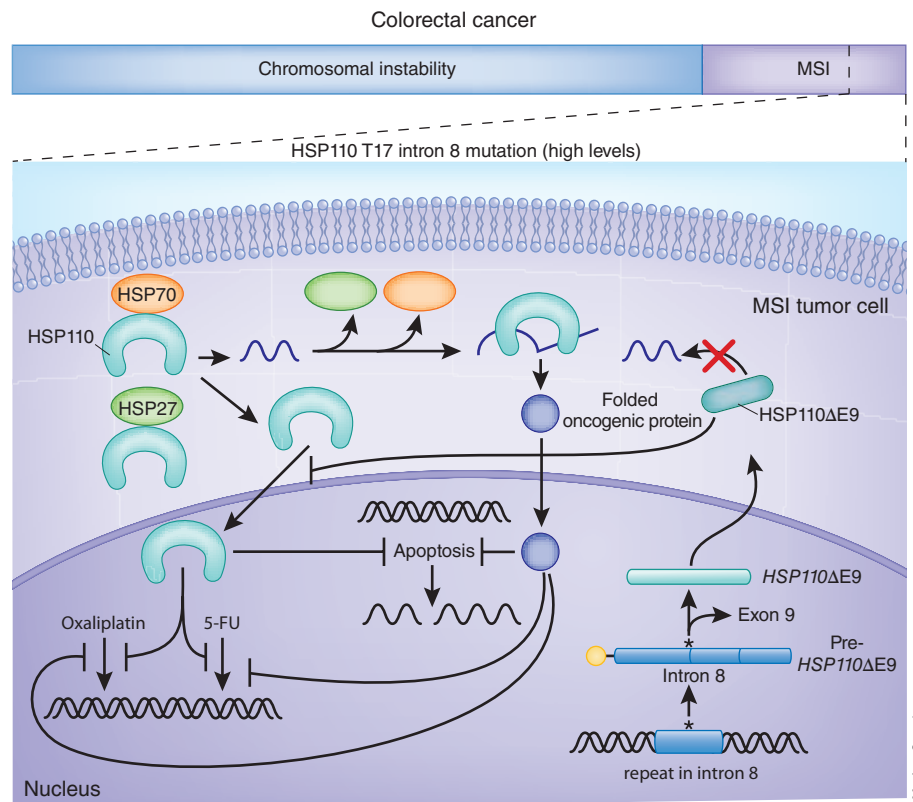


Figure 1 Model for the interaction of HSP110 and HSP110ΔE9 in colorectal cancers. About 15% of colorectal cancers arise through defects in DNA mismatch repair, resulting in tumors with MSI. Dorard *et al.*⁸ show that MSI tumors universally harbor mutations in *HSP110* T₁₇ intron 8, which results in production of a truncated protein, HSP110ΔE9, that lacks a substrate binding domain and is unable to serve as a molecular chaperone for other HSPs (HSP70 or HSP27). The mutant protein HSP110ΔE9 also associates with wild-type HSP110, blocking its translocation into the nucleus and its chaperone function (for example, folding of cancer mediators)—and perhaps directly inhibiting apoptosis or the action of chemotherapeutic agents. In a subset of about 30% of MSI tumors, a high level of HSP110ΔE9 seems to be associated with improved survival. Variation in HSP110ΔE9 expression results in additional molecular heterogeneity of colorectal cancers with MSI with functional consequences on cancer pathways, responsiveness to treatment and survival of individuals with MSI CRC.

5-FU and oxaliplatin, another commonly used chemotherapeutic. These observations seemed to translate into improved clinical outcomes—in two retrospective cohorts of people with MSI CRC, individuals with a high HSP110ΔE9/HSP110wt ratio had longer disease-free survival compared to those with a low ratio.

Several aspects of this new study are notable. First, these results provide evidence for an additional layer of molecular heterogeneity specific to MSI CRC, with the potential to serve as a biomarker for prognosis and treatment response as well as a therapeutic target. Second, *HSP110* joins the relatively short list of genes, which include *TGFBR2* and *BAX*, that are targeted by microsatellite sequence mutations and that are largely otherwise functionally anonymous^{11,12}. Remarkably, *HSP110* T₁₇ mutations were detected in 100% of the MSI tumors examined, far exceeding the observed prevalence of mutations in these other genes. Third, these mutations harbor particular functional importance

as examples of 'dominant negative' alterations, yielding an HSP110ΔE9 product that not only lacks the proneoplastic properties of the wild-type protein but actually functions as its potent inhibitor, as well. These results could provide a rationale for the development of new therapeutic agents mimicking HSP110ΔE9 function, adding to the pipeline of HSP inhibitors currently being tested in various cancers⁹.

These findings, though provocative, are far from conclusive and leave several areas of uncertainty. First, the clinical observation that HSP110ΔE9 expression correlates with clinical outcome is predicated on a small number of subjects (50 with stage 2 and 34 with stage 3 CRC). Validation in larger cohorts with a sufficient numbers to examine stage-specific effects will be of paramount importance. Second, the investigators conclude that HSP110ΔE9 was associated with improved chemotherapeutic response on the basis of observations that high HSP110ΔE9 expression was associated with

disease-free survival among those patients who received chemotherapy. But this analysis conflates the effects of stage with chemotherapy on survival (receipt of chemotherapy was highly correlated with stage 3 disease) and does not specifically determine the impact of chemotherapy on outcome. Before it can be concluded that HSP110ΔE9 expression improves chemotherapeutic efficacy, an adequately powered analysis examining the effect of chemotherapy on survival within strata defined by HSP110ΔE9 expression level is needed.

Third, the cutoff values used to define high versus low expression of HSP110ΔE9/HSP110wt ratio were not uniform across the two subject cohorts and were specifically chosen to maximize survival differences. Prospectively selected cutoff values may show less optimistic results about the prognostic potential of HSP110ΔE9. Moreover, it is uncertain whether there is a clear 'threshold' level of HSP110ΔE9 expression associated with clinical outcome or whether the benefits in survival progressively increase in parallel with HSP110ΔE9 expression. If the relationship is the latter, then

translating HSP110ΔE9 into a clinically useful marker of prognosis may require testing in large populations to determine a reference range and clinical cutoff values that will optimize performance characteristics.

But perhaps the most tantalizing question provoked by the study of Dorard *et al.*⁸ is whether HSP110ΔE9 expression somehow provides a mechanistic basis for the more favorable outcomes observed in people with MSI CRC or the likelihood that these individuals derive less benefit from 5-FU chemotherapy. To address this possibility, it will be important to determine how expression of HSP110ΔE9 correlates with the clinical behavior of MSI tumors as compared to MSS tumors. It is fascinating to speculate that such studies might show a lack of response to 5-FU confined to the 65–70% of MSI CRCs with low levels of HSP110ΔE9. Such a result would provide a mechanistic explanation for why most individuals with MSI CRCs do not seem to benefit from 5-FU treatment, thereby strengthening the case that this observation reflects a true lack of sensitivity of most MSI CRCs to this drug. Thus, the findings of Dorard *et al.*⁸ may be a

first step in achieving a near-term goal of using MSI status to select patients for 5-FU treatment as we await efforts to develop molecularly specific agents that exploit the unique mechanisms of these cancers.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The author declares competing financial interests: details accompany the full-text HTML version of the paper at <http://www.nature.com/naturemedicine/>.

1. Boland, C.R. & Goel, A. *Gastroenterology* **138**, 2073–2087 (2010).
2. Ribic, C.M. *et al. N. Engl. J. Med.* **349**, 247–257 (2003).
3. Sargent, D.J. *et al. J. Clin. Oncol.* **28**, 3219–3226 (2010).
4. Popat, S., Hubner, R. & Houlston, R.S. *J. Clin. Oncol.* **23**, 609–618 (2005).
5. Sinicrope, F.A. *et al. J. Natl. Cancer Inst.* **103**, 863–875 (2011).
6. Elsaleh, H. *et al. Lancet* **355**, 1745–1750 (2000).
7. Tejpar, S., Saridaki, Z., Delorenzi, M., Bosman, F. & Roth, A.D. *J. Natl. Cancer Inst.* **103**, 841–844 (2011).
8. Dorard, C. *et al. Nat. Med.* **17**, 1283–1289 (2011).
9. Khalil, A.A., Kabapy, N.F., Deraz, S.F. & Smith, C. *Biochim. Biophys. Acta* **1816**, 89–104 (2011).
10. Slaby, O. *et al. Oncol. Rep.* **21**, 1235–1241 (2009).
11. Markowitz, S. *et al. Science* **268**, 1336–1338 (1995).
12. Rampino, N. *et al. Science* **275**, 967–969 (1997).

EGFR signaling in podocytes at the root of glomerular disease

Ray Harris

A study in a mouse model of immune-mediated glomerular disease and in people with rapidly progressive glomerulonephritis shows activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in podocytes by a molecule expressed in the kidney (pages 1242–1250). Blocking this axis may open new doors to treat inflammatory kidney conditions.

Evolution has fashioned the glomerulus of the mammalian kidney into an integrated unit to provide essential blood filtration. Each of the million or so glomeruli in the human kidney consists of a cluster of capillary loops composed of a fenestrated endothelium overlaid by interdigitating foot processes of specialized epithelia called podocytes, which, together with the endothelial cells, is the source of an interposing glomerular basement membrane (GBM). Mesenchymal mesangial cells and their associated extracellular matrix support the interstices of these capillary tufts. Bowman's capsule, which is composed of parietal epithelial cells, separates the tuft from surrounding renal parenchyma

by forming a urinary space connecting to a proximal tubular lumen.

Unfortunately, the glomerulus is the target for a variety of inflammatory and non-inflammatory forms of injury. The most severe inflammatory injury is rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN), which is characterized by a precipitous loss of glomerular filtration and by the accumulation of CD4⁺ T cells and macrophages in the tuft, proliferation of endogenous glomerular cells and the development of cellular crescents, which result from glomerular capillary damage and subsequent leakage of plasma proteins into Bowman's space. Crescents consist of fibrous material and proliferating cells arising from both the parietal epithelial cells and from podocytes, as well as infiltrating macrophages and myofibroblasts¹.

RPGN is a clinical syndrome that can result from a number of diseases, one of which is anti-GBM disease, an autoimmune condition

in which individuals develop cytotoxic antibodies targeted to the GBM. In the current issue of *Nature Medicine*, Bollée *et al.*² in a mouse model of anti-GBM disease show that the activation of EGFR in podocytes by one of its ligands, heparin-binding EGF (HB-EGF), results in the development and progression of RPGN. Pharmacological blockade or genetic deletion of the HB-EGF–EGFR axis in podocytes improved the course of RPGN in mice and prevented infiltration of inflammatory cells. These findings may open new therapeutic avenues to tackle crescentic and immune-mediated glomerular disease.

The EGFR is a member of the family of ErbB receptors, which is widely expressed, including in mammalian kidney³. Upon activation, there is phosphorylation of residues that serve as docking sites for a variety of signaling molecules that activate intracellular pathways controlling cell proliferation, differentiation

Ray Harris is at the Division of Nephrology and Hypertension, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA.
e-mail: raymond.harris@vanderbilt.edu

DISCUSSIONS & PERSPECTIVES

I) Rôle de la mutation du gène *HSP110* dans la physiopathologie des CCR

A notre connaissance, nous rapportons dans ce travail pour la première fois la mutation d'une protéine chaperonne dans une pathologie tumorale. De façon très intéressante et surprenante, la mutation inhibe l'activité de l'oncoprotéine chaperonne HSP110, entraînant la perte de ses fonctions pro-tumorigéniques (de résistance à l'apoptose et pro-proliférative). Dans ce qui va suivre, il faut découpler deux aspects distincts de notre travail qui sont pourtant directement liés à la mutation que nous avons détectée sur *HSP110* dans les CCR. Le premier aspect concerne le mutant HSP110DE9 et les propriétés de ce mutant. Nous avons en effet clairement démontré que ce mutant HSP110DE9, bien qu'il ait des propriétés de dominance négative par rapport à la chaperonne sauvage, était dégradé de manière massive dans les cellules tumorales du fait du NMD. La prise en compte de son activité est donc sans objet sur un plan physiopathologique. En revanche, il est très intéressant de la considérer en tant qu'outil protéique capable d'inhiber l'activité d'HSP110 à visée thérapeutique. Le deuxième aspect concerne la perte de fonction de la chaperonne HSP110 sauvage dans les cellules tumorales. Cette perte de fonction est la vraie conséquence physiopathologique de la mutation d'*HSP110* dans les CCR. Elle est de plus en plus marquée au fur et à mesure que la délétion est de grande taille dans des cellules MMR déficientes en division qui accumulent des erreurs de réplication non réparées au cours de la progression tumorale. Elle est en particulier totale dans les CCR MSI avec délétion 'large' du T₁₇, et les conséquences sont alors importantes tant sur un plan physiopathologique (mais aussi concernant la réponse au traitement des patients à la chimiothérapie). Elle n'est que partielle dans les CCR MSI avec délétion 'small', sans conséquence objectivable pour l'instant dans ces tumeurs.

Concernant l'impact de la mutation sur le processus apoptotique, nos travaux ont surtout permis d'identifier une perte de la capacité des cellules mutantes à résister à une apoptose induite par les drogues (chimiosensibilisation dans le contexte d'un statut 'large' de la mutation). Nous ne savons pas encore clairement comment cette mutation interfère avec les voies apoptotiques dans la cellule tumorale et si elle peut favoriser une mort cellulaire dans d'autres contextes de stress au cours de la progression tumorale (processus métastatique, migration, invasion, ...). A visée cognitive, il serait aussi

intéressant d'aller regarder par quel mécanisme l'apoptose pourrait être modulée dans des modèles cellulaires MSI (sous clones cellulaires) et MSS (HSP110 sauvage) mais également dans des tumeurs primaires de cancers colorectaux MSI ou MSS. Nous pourrions par exemple analyser des marqueurs de l'apoptose par une approche de cytométrie en flux dans les modèles cellulaires, mais également par des approches d'immunohistochimie dans des tumeurs primaires de CCR MSI. Ces travaux permettraient de mieux appréhender le rôle d'HSP110 dans l'apoptose, aussi bien dans la voie intrinsèque qu'extrinsèque, en comparaison de ce qui est déjà rapporté pour les autres chaperonnes (cf. le rôle ambivalent d'HSP90 qui peut inhiber ou favoriser l'apoptose dans différents contextes par exemple, ...).

A l'inverse, nous avons pu déjà identifier, grâce en particulier à nos modèles de sous-clones cellulaires que, d'un point de vue physiopathologique, la mutation du microsatellite T₁₇ d'*HSP110* et la perte de fonction de la chaperonne en conséquence inhibait clairement la prolifération cellulaire (*in vitro*) et la croissance tumorale (*in vivo*).

Dans notre étude, nous proposons un mécanisme qui pourrait expliquer cet effet antiprolifératif. L'inactivation d'HSP110 semble empêcher en effet la phosphorylation de STAT3 ainsi que sa translocation nucléaire, diminuant ainsi l'activité de cette voie essentielle dans les CCR. Ces deux étapes sont nécessaires pour activer l'expression des gènes cibles de PSTAT-3 qui ne sont alors plus transactivés²⁴³. De plus, STAT3 jouerait un rôle crucial dans la survie, les métastases et l'angiogenèse²⁴³.

Ce mécanisme est une des explications de l'impact de cette mutation d'*HSP110* sur la prolifération et la croissance tumorale, mais il est très probable que d'autres processus soient perturbés dans la cellule secondairement à l'inactivation d'HSP110 dans les CCR MSI. Afin d'identifier d'autres voies/mécanismes cibles, l'étude de l'impact de cette mutation sur la tumorigenèse MSI sera envisagée d'une manière plus globale grâce à un modèle murin HSP110de9-KI (voir ci-dessous) qui permettra de reproduire à l'identique le contexte d'expression d'HSP110 secondairement à la survenue de la mutation du T₁₇. Nous savons que les tumeurs MSI sont caractérisées par une initiation tumorale rapide, mais en revanche une progression par la suite beaucoup plus lente et qu'elles sont très peu métastatiques. Nous suspectons dans le contexte que la mutation d'*HSP110* soit une

des explications à cette cinétique de développement très particulier et peu invasif à distance des tumeurs MSI.

En plus de posséder sa propre activité de chaperonne, HSP110 est également un facteur d'échange nucléotidique (NEF) pour d'autres protéines chaperonnes, en particulier HSP70. Différentes publications décrivent qu'HSP70 serait impliquée dans l'invasion tumorale ainsi que la formation de métastases. La mutation d'*HSP110* pourrait donc moduler l'activité de la protéine HSP70 tout en impactant les protéines cibles de cette chaperonne. D'une manière générale, il serait intéressant d'identifier, parmi les conséquences fonctionnelles engendrées par la perte d'expression d'HSP110 dans les CCR MSI, celles qui dépendent directement d'HSP110 et celles qui sont en fait dépendantes des complexes qu'elle forme avec ces partenaires, en particulier HSP70. De manière intéressante, nous venons au laboratoire de montrer en IHC que la perte d'expression d'HSP110 était très corrélée à celle d'HSP70, suggérant bien que ces deux chaperonnes s'expriment et jouent leur rôle de manière concertée.

Enfin, malgré l'impact délétère de la mutation du gène *HSP110* dans les CCR MSI, il faut pourtant essayer d'expliquer la raison pour laquelle cette mutation est très fréquente sinon systématique dans les cellules tumorales MSI. Il y a probablement 2 raisons à cela : (i) les longues répétitions mononucléotidiques telle que le T₁₇ située dans l'intron 8 d'*HSP110* qui représentent des points obligatoires de mutations dans les tumeurs MSI, consécutivement à leur déficience MMR ; (ii) le NMD qui par son activité de dégradation du mutant *HSP110DE9* empêche son activité délétère dominante négative.

En plus des propositions qui viennent d'être faites, voici d'autres perspectives qui pourraient être investiguées à plus ou moins long terme sur cet axe. Nous avons initié au laboratoire la construction d'un modèle murin Knock-In (KI) qui porte la mutation du gène *HSP110* dans son ADN germlinal et exprime la protéine mutante de manière constitutive (HSP110de9-KI). Pour évaluer l'implication de la mutation d'*HSP110* sur le processus MSI, ces souris seront croisées avec des souris MMR-déficientes (MSH2-KO à l'état hétérozygote ou homozygote) qui développent spontanément des tumeurs MSI. Nous

pourrons ainsi suivre l'effet de l'expression d'HSP110DE9 sur l'initiation et la progression tumorale MSI.

Comme je l'ai déjà indiqué dans l'introduction, HSP110 semble sinon réguler l'expression de CD1d à la surface de cellules présentatrices d'antigènes, incluant les cellules épithéliales intestinales^{232, 233}. Ils vont présenter les antigènes lipidiques aux cellules NK-T (pour Natural-Killer T), stimulant ainsi une réponse immunitaire. Dans nos différentes études, nous n'avons jamais regardé quel pourrait être l'impact de la mutation d'HSP110 sur l'immunité anti-tumorale dans les CCR MSI. C'est un axe qui semble très intéressant à investiguer, et qui permettrait de savoir comment la mutation d'HSP110 peut moduler une des caractéristiques connues des CCR MSI, à savoir celle d'être des néoplasmes très immunogènes.

II) Impact pronostique de la mutation du gène HSP110 dans les CCR MSI

Dans notre première publication, nous avons suggéré que le ratio *HSP110DE9/HSP110wt* dans les CCR MSI soit un indicateur de la réponse des patients à la chimiothérapie. Il convient de préciser que ces résultats ont été obtenus sur une série très limitée de patients du fait que la technique de RT-PCR quantitative utilisée pour évaluer l'expression du transcrit *HSP110DE9* n'est pas appropriée pour l'étude d'une série importante de malades (nécessité d'avoir des prélèvements de grande qualité et très bien conservés). La qualité de l'ARN influence en effet les résultats de RT-PCR quantitative, en plus du pourcentage de contamination des échantillons par le tissu sain non tumoral qui dilue en quelque sorte le taux de transcrit mutant dans les échantillons analysés non macro-disséqués. Nous avons donc par la suite utilisé la méthode de PCR et d'analyse de fragment sur l'ADN tumoral, beaucoup plus robuste et permettant de s'affranchir de la contamination en tissu sain de l'échantillon. Par cette technique, nous avons pu également retrouver que la taille de la délétion du T₁₇ (qui corrèle à la perte d'expression de la chaperonne dans les CCR) était un indicateur de la réponse des patients à la chimiothérapie. De manière intéressante, ils ont été générés à partir de l'analyse d'une série plus conséquente de malades en provenance de plusieurs centres cliniques, en France et à l'international.

Néanmoins, il existe quelques limites à cette étude qui nous amène à rester encore très prudent sur la réelle contribution de la mutation d'*HSP110* en clinique. Etant donné le faible nombre de patients avec une large délétion du microsatellite T₁₇ (environ 25% des patients avec un CCR MSI), la relevance clinique de nos données nécessite encore d'être investiguée plus avant. De plus, le criblage de la délétion du microsatellite T₁₇ a été réalisé de manière rétrospective, ce qui peut introduire d'éventuels biais. Néanmoins, on peut préciser que notre cohorte de tumeur MSI est l'une des plus conséquente jamais constituée pour des analyses de survie, et que les échantillons ont été recueillis de manière consécutive et prospective au moment du diagnostic.

De manière intéressante, une récente étude basée sur l'analyse immunohistochimique d'une petite cohorte de tumeur a confirmé en grande partie nos données, en indiquant que l'expression d'*HSP110*wt constituerait probablement un facteur de pronostic dans les CCR MSI ²⁴⁶. En dépit du fait qu'il trouve une corrélation inverse entre l'expression d'*HSP110*wt et la taille de la délétion du microsatellite T₁₇, les auteurs n'observent pas cependant d'impact significatif de la mutation (taille de la délétion) sur la survie des patients. Ceci peut-être dû à plusieurs raisons, incluant la manière dont laquelle la délétion du T₁₇ a été évaluée dans les tumeurs. L'analyse doit être en effet standardisée et prendre en compte le polymorphisme de ce marqueur et l'hétérogénéité du contingent tumoral. Les autres raisons pouvant être la taille relativement petite de leur cohorte (en ce qui concerne les malades sous chimiothérapie) et le *design* des analyses de survie.

En perspective de cet axe, il est indispensable, dans un premier temps, de confirmer sur une série plus conséquente de tumeurs MSI l'impact pronostique de la mutation d'*HSP110* sur la réponse aux traitements par chimiothérapie à base de 5-FU dans les CCR. Par la suite, il sera très important de mettre au point une méthode standardisée pour évaluer cet impact, en prenant mieux en compte l'hétérogénéité du contingent tumoral. A ce titre, nous mettons au point une analyse du statut d'*HSP110* dans les CCR par IHC, une méthode morphologique plus à même de caractériser le statut d'*HSP110* à l'échelon cellulaire dans la masse tumorale. En outre, le séquençage profond est une méthode de choix pour avoir un aperçu des profils de mutations de populations clonales dans une tumeur lorsqu'ils varient, comme c'est le cas avec notre marqueur.

Dans notre étude, nous avons analysé l'effet en survie de la délétion du microsatellite T₁₇ en considérant de manière concomitante différents critères clinico-biologiques (analyses multi-variées) incluant le stade de la tumeur (TNM), la localisation de la tumeur sur le cadre colique (gauche ou droite), le type de chimiothérapie (5-FU seul ou FOLFOX), le sexe des patients, leur âge, le contexte de survenue du cancer (héréditaire ou sporadique). Nous avons également analysé l'effet éventuel d'autres mutations récurrentes dans les tumeurs MSI au niveau de 16 gènes cibles contenant un microsatellite codant, démontrant l'absence d'une relevance clinique de ces altérations. Néanmoins, nous n'avons pas regardé si l'effet de la mutation du gène *HSP110* était indépendant ou non de celui d'autres marqueurs moléculaires qui ont ou pourraient avoir une influence sur le pronostic et la réponse au traitement des cancers colorectaux. Je parle notamment de la prise en compte du phénotype CIMP du cancer, ou encore de la présence de mutations somatiques affectant les gènes *BRAF*, *KRAS* ou encore *PIK3CA*. Il serait intéressant de réaliser ces analyses, en plus de continuer le criblage d'autres séries tumorales pour valider ou non l'effet pronostique de la mutation d'*HSP110* en survie chez les malades. L'effet de la mutation d'*HSP110* dans la tumeur sur la réponse des malades à une chimiothérapie par 5-FU seul est particulièrement d'intérêt. Le 5-FU n'est en effet plus donné aujourd'hui en première intention dans les CCR de stade III puisque le nouveau standard est le FOLFOX (combinaison 5-FU et Oxaliplatine) qui a montré sa supériorité. Néanmoins, le FOLFOX restant une ligne de chimiothérapie non dépourvue d'effets secondaires et qui n'est pas toujours bien tolérée par les patients, il serait intéressant de montrer plus clairement qu'une catégorie de malades avec un CCR répond déjà de manière très satisfaisante au 5-FU seul (ce qui pourrait être le cas des patients avec un CCR MSI de statut *HSP110* 'large' d'après nos résultats, puisqu'aucune rechute n'a été observée dans ce groupe, que les patients aient reçus du 5-FU seul ou du FOLFOX).

Il sera également intéressant d'aller investiguer le statut mutationnel d'*HSP110* dans d'autres types tumoraux appartenant au spectre des cancers MSI, notamment les cancers de l'estomac et de l'endomètre. Nos études préliminaires indiquent que le microsatellite T₁₇ est délété dans ces cancers, avec cependant une fréquence moindre (environ 70%) pour les cancers de l'endomètre par rapport aux cancers gastriques et colorectaux (données non montrées), au même titre que les autres gènes cibles de l'instabilité

microsatellitaire. De manière très intéressante, nos données préliminaires suggèrent que la mutation d'*HSP110* serait également d'intérêt clinique dans les cancers gastriques MSI (données non montrées).

III) Intérêt diagnostique de la mutation du gène *HSP110* dans les CCR MSI

Le criblage des CCR pour la mise en évidence du statut MSI est maintenant recommandé pour toute nouvelle tumeur diagnostiquée. Dans notre dernière publication, nous proposons que le microsatellite T₁₇ soit considéré comme un marqueur diagnostique pour déterminer le statut MSI des CCR, au même titre que ceux utilisés aujourd'hui. Nous montrons que le marqueur T₁₇ est plus sensible et plus spécifique que la pentaplex pour détecter les CCR MSI, en particulier du fait de son monomorphisme exceptionnel comparé aux autres marqueurs.

Cette faible variation dans l'ADN normal pour un microsatellite non codant est assez surprenante et nous suggérons que cette observation est probablement due au rôle important de ce microsatellite T₁₇ dans l'épissage du gène *HSP110*, dont la conservation de taille est requise pour permettre un épissage correct de l'exon 9, comme nous le démontrons très clairement dans nos travaux.

De plus, et à l'inverse des marqueurs pentaplex, la lecture du profil T₁₇ des tumeurs est simple et facile à interpréter, permettant même d'envisager qu'elle soit automatisée après la réalisation d'un calibrage nécessaire du logiciel d'analyse sur des ADN contrôles pour bien repérer la région polymorphe. Une des limites de l'utilisation en routine comme marqueur de la répétition T₁₇ est la contamination de la tumeur par un contingent variable de cellules normales, suite à l'infiltration assez récurrente des tumeurs MSI par des lymphocytes intra-épithéliaux. Mais là encore, nos données établissent que cette contingence est moins à même de gêner l'interprétation du T₁₇ que celle des autres marqueurs. Notre étude indique néanmoins qu'un nombre minimum de cellules tumorales est requis au sein de l'échantillon. Aujourd'hui, nous préconisons que le marqueur T₁₇ soit utilisé en combinaison des autres marqueurs standards pour permettre l'acquisition d'un recul clinique nécessaire par les différents centres. La réalisation d'un génotypage systématique de ce marqueur sera prochainement mise en oeuvre sur l'hôpital Saint-Antoine, en combinaison aux marqueurs de la pentaplex et à

l'immunohistochimie, puisque notre hôpital est un site pionnier pour la détection et la prise en charge des patients avec un CCR MSI depuis plusieurs années.

IV) Proposition thérapeutique

Nous montrons dans nos travaux que la perte d'activité du système NMD permet de débriider l'expression d'*HSP110DE9* dans les cellules tumorales MSI. Par une inhibition du NMD, nous observons des effets qui sont assez similaires à ceux consécutifs à une surexpression forcée du mutant HSP110DE9 dans les cellules tumorales. Ces effets récapitulent ce qui est secondaire à la perte d'activité d'HSP110 puisque le mutant HSP110DE9 est un inhibiteur endogène de cette chaperonne. De manière remarquable, de tels effets ont pu être observés *in vivo* suite à l'utilisation chez la souris (modèle nude xénogreffé avec tumeurs humaines) d'un inhibiteur du NMD, l'Amlexanox, qui est une drogue déjà utilisée en clinique chez l'homme (traitement des aphtes, de l'asthme). Ces données pré-cliniques sont très encourageantes et suggèrent que l'inhibition du NMD puisse devenir une stratégie thérapeutique pour le traitement des CCR MSI tenant compte de leurs caractéristiques moléculaires (*e.g.* mutation d'*HSP110*, médecine personnalisée des patients).

Nos études mettent en avant le rôle oncogénique du NMD dans la tumorigenèse MSI colique, son activité contribuant ainsi à préserver les cellules cancéreuses de l'effet anti-tumorigénique du mutant dominant négatif HSP110DE9. Cependant, l'Amlexanox n'est pas un inhibiteur très puissant du NMD, et il sera nécessaire de trouver demain de nouveaux inhibiteurs plus puissants de ce système, qui pourront être utilisés en clinique. En outre, l'Amlexanox a été rapporté dans la littérature pour avoir d'autres propriétés qu'il faut prendre en compte (traitement de l'obésité et des maladies inflammatoires ; action de cette molécule sur une signalisation IKK et NFkB) ²⁴⁷.

Il est clair que l'inhibition du système NMD dans les cellules cancéreuses MSI engendre, outre *HSP110DE9*, la réexpression de nombreux gènes cibles mutants qui s'expriment de manière aberrante dans ces tumeurs ¹⁴³ (mutations de microsatellites codants, synthèse d'un transcrit avec un PTC en conséquence ; cf. introduction pour plus de détails). Dans ce

contexte, nos données établissent pourtant que l'inhibition du NMD dans les CCR MSI a un effet clairement anti-oncogénique, assez proche de celui engendré par la ré-expression du mutant *HSP110DE9* dans nos mains. Pour expliquer ces faits, nous avançons l'hypothèse que la plupart des mutants cibles de MSI dont l'expression est NMD-sensible soient en fait des mutants 'pertes de fonction' codant pour des protéines suppressives de tumeurs tronquées n'ayant pas conservée de fonction biologique résiduelle (et dont la ré-expression n'est donc pas fonctionnellement relevante). Les publications du domaine permettent d'avancer cette hypothèse puisque les mutations des gènes cibles les plus fréquemment observées dans les CCR MSI sont en effet clairement des pertes de fonction et affectent des gènes suppresseurs de tumeurs ou apparentés (*TGFBR2*, *BAX*, *IGF2R*, *MSH3*, *MSH6*, ...). Le cas du mutant *HSP110DE9* serait donc une exception à cette règle, du fait que la mutation affecte dans ce cas un oncogène et que la cellule n'a pas les moyens d'empêcher sa survenue (cf. supra, en particulier à cause de la grande taille de la répétition).

Les perspectives de cet axe sont multiples. Dans un premier temps, il sera nécessaire de tester, comme cela à déjà été évoqué, d'autres inhibiteurs NMD qui seront plus puissant que l'Amlexanox et afin de pouvoir potentialiser de façon plus importante la réexpression d'*HSP110DE9* en particulier. Actuellement, nous sommes en train de tester un nouvel inhibiteur, NMDI1²⁴⁸. Par ailleurs, il est remarquable que la perte d'activité du NMD est susceptible de favoriser la synthèse de nombreuses protéines avec des extrémités C-Ter aberrantes et possédant des propriétés néo-oncogéniques, comme ceci a été suggéré par certains travaux de mon laboratoire. La ré-expression de telles protéines néo-antigéniques est susceptible de favoriser le processus d'immunité anti-tumorale que l'hôte développe contre son cancer et dont l'intensité est clairement un critère de bon pronostic dans les CCR MSI⁹². Cet aspect n'a pas du tout été investigué dans mes travaux, et je pense qu'il serait très intéressant d'aller plus avant sur cet axe de travail, notamment par l'exploitation de modèles murins MMR-déficients que nous traiterons avec des inhibiteurs du NMD.

D'autres thérapies plus spécifiques et ciblant HSP110 directement peuvent être bien sûr envisagées. Nos études *in vitro* et *in silico* ont montré qu'une molécule d'*HSP110DE9*

interagissait avec une molécule d'HSP110wt, éclairant le mode selon lequel ce mutant empêche la fonction de la protéine sauvage. Actuellement, nous poursuivons une collaboration avec un autre laboratoire (équipe de Carmen Garrido, Dijon, France) afin d'identifier des molécules qui seront à même de mimer la petite protéine HSP110DE9 et son effet thérapeutique (chimio-mimétiques, peptido-mimétiques). L'identification de ces molécules est en cours et il faudra à la suite réaliser des tests pour valider leur effet dans des modèles animaux et pré-cliniques.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces dernières années, la recherche dans le domaine de la génétique des tumeurs a permis d'aboutir à des avancées très significatives. Elle a en particulier été très éclairante pour identifier les mécanismes qui sous-tendent l'initiation et la progression des cancers, notamment dans le côlon. L'objectif majeur de cette recherche est, sur un plan translationnel et clinique, d'aboutir à l'identification de cibles physiopathologiques et thérapeutiques d'intérêt. A terme, le développement de cette recherche permettra la mise en œuvre d'une médecine personnalisée pour chaque patient, tenant compte des caractéristiques de sa tumeur. Mes travaux s'inscrivent très clairement dans ce cadre et pourront je l'espère aboutir à une valorisation plus concrète prochainement.

Sur un plan physiopathologique et cognitif, mes travaux se sont sinon intéressés à certaines conséquences encore très peu investiguées de l'instabilité microsatellitaire dans le génome tumoral, celles relatives aux mutations de répétitions non codantes que ce mode majeur d'instabilité génétique provoque au niveau des sites donneurs/accepteurs d'épissage des gènes. La mutation d'*HSP110* représente à ce titre un exemple de ce qui pourrait être un phénomène redondant dans le génome de ces tumeurs, à savoir la survenue de mutations provoquant des perturbations d'épissage en nombre. A ce titre, elle semble contribuer au meilleur pronostic des cancers colorectaux MSI et pourrait être responsable de certaines de leurs caractéristiques phénotypiques. Très récemment, une autre étude a rapporté que le gène *MRE11*, également affecté par une mutation d'épissage dans ces cancers, était associé à un meilleur pronostic dans les cancers colorectaux, cette fois-ci sans rapport avec une prise en charge des patients par chimiothérapie ²⁴⁹. Ces résultats suggèrent que l'instabilité microsatellitaire et les conséquences qu'elle peut avoir sur la transformation de la cellule sont encore des domaines à explorer. L'avènement du grand séquençage permettra d'accélérer nos connaissances dans ce domaine et le laboratoire d'accueil s'est déjà très largement engagé dans cette voie.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bert Vogelstein, K.W.K. The Genetic Basis of Human Cancer (McGraw Hill Professional; 2 edition, 2002).
2. Allan, W.R. The Biology of Cancer (Garland Science, 2007).
3. American Joint Committee on Cancer. Colon and Rectum. In: Fleming ID, C.J., Henson DE et al, eds. AJCC cancer staging manual. 5th ed. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven Publishers, 83-90 (1997).
4. Pino, M.S. & Chung, D.C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* **138**, 2059-72 (2010).
5. Toyota, M. et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8681-6 (1999).
6. Fang, M., Ou, J., Hutchinson, L. & Green, M.R. The BRAF Oncoprotein Functions through the Transcriptional Repressor MAFK to Mediate the CpG Island Methylator Phenotype. *Mol Cell* **55**, 904-15 (2014).
7. Boland, C.R. & Goel, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* **138**, 2073-2087 e3 (2010).
8. Grady, W.M. & Carethers, J.M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* **135**, 1079-99 (2008).
9. Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363**, 558-61 (1993).
10. Aaltonen, L.A. et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* **260**, 812-6 (1993).
11. Thibodeau, S.N., Bren, G. & Schaid, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* **260**, 816-9 (1993).
12. Peltomaki, P. et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* **260**, 810-2 (1993).
13. Lindblom, A., Tannergard, P., Werelius, B. & Nordenskjold, M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet* **5**, 279-82 (1993).
14. Fishel, R. et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* **75**, 1027-38 (1993).
15. Leach, F.S. et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* **75**, 1215-25 (1993).
16. Bronner, C.E. et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* **368**, 258-61 (1994).
17. Papadopoulos, N. et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* **263**, 1625-9 (1994).
18. Hickman, M.J. & Samson, L.D. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10764-9 (1999).
19. Modrich, P. Methyl-directed DNA mismatch correction. *J Biol Chem* **264**, 6597-600 (1989).
20. Jacob, S. & Praz, F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* **84**, 27-47 (2002).

21. Akiyama, Y. et al. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res* **57**, 3920-3 (1997).
22. Nicolaides, N.C. et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* **371**, 75-80 (1994).
23. Kane, M.F. et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* **57**, 808-11 (1997).
24. Herman, J.G. et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6870-5 (1998).
25. Veigl, M.L. et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8698-702 (1998).
26. Haraldsdottir, S. et al. Colon and Endometrial Cancers with Mismatch Repair Deficiency can Arise from Somatic, Rather Than Germline, Mutations. *Gastroenterology* (2014).
27. Edelmann, L. & Edelmann, W. Loss of DNA mismatch repair function and cancer predisposition in the mouse: animal models for human hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **129C**, 91-9 (2004).
28. Peltomaki, P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* **21**, 1174-9 (2003).
29. Peltomaki, P. & Vasen, H. Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers* **20**, 269-76 (2004).
30. Vasen, H.F., Mecklin, J.P., Khan, P.M. & Lynch, H.T. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* **34**, 424-5 (1991).
31. Vasen, H.F., Watson, P., Mecklin, J.P. & Lynch, H.T. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* **116**, 1453-6 (1999).
32. Rodriguez-Bigas, M.A. et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* **89**, 1758-62 (1997).
33. Umar, A. et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* **96**, 261-8 (2004).
34. Boland, C.R. et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**, 5248-57 (1998).
35. Capel, E., Flejou, J.F. & Hamelin, R. Assessment of MLH1 promoter methylation in relation to gene expression requires specific analysis. *Oncogene* **26**, 7596-600 (2007).

36. Kim, H., Jen, J., Vogelstein, B. & Hamilton, S.R. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* **145**, 148-56 (1994).
37. Jass, J.R. et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* **42**, 673-9 (1998).
38. Gryfe, R. et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* **342**, 69-77 (2000).
39. Popat, S., Hubner, R. & Houlston, R.S. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* **23**, 609-18 (2005).
40. Goldstein, J. et al. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann Oncol* **25**, 1032-8 (2014).
41. Jass, J.R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* **50**, 113-30 (2007).
42. Samadder, N.J. et al. Associations between colorectal cancer molecular markers and pathways with clinicopathologic features in older women. *Gastroenterology* **145**, 348-56 e1-2 (2013).
43. Leggett, B. & Whitehall, V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* **138**, 2088-100 (2010).
44. Sinicrope, F.A. et al. Molecular Markers Identify Subtypes of Stage III Colon Cancer Associated with Patient Outcomes. *Gastroenterology* (2014).
45. Domingo, E. et al. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene* **24**, 3995-8 (2005).
46. Rajagopalan, H. et al. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* **418**, 934 (2002).
47. Ogino, S. et al. KRAS mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res* **15**, 7322-9 (2009).
48. Marisa, L. et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med* **10**, e1001453 (2013).
49. De Sousa, E.M.F. et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med* **19**, 614-8 (2013).
50. Sadanandam, A. et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med* **19**, 619-25 (2013).
51. Suraweera, N. et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* **123**, 1804-11 (2002).
52. Wong, Y.F. et al. Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers. *Carcinogenesis* **27**, 951-5 (2006).
53. Andre, T. et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* **350**, 2343-51 (2004).
54. Heidelberger, C. et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* **179**, 663-6 (1957).

55. Carethers, J.M. et al. Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology* **117**, 123-31 (1999).
56. Parker, W.B. & Cheng, Y.C. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther* **48**, 381-95 (1990).
57. Major, P.P., Egan, E., Herrick, D. & Kufe, D.W. 5-Fluorouracil incorporation in DNA of human breast carcinoma cells. *Cancer Res* **42**, 3005-9 (1982).
58. Ribic, C.M. et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* **349**, 247-57 (2003).
59. Carethers, J.M. et al. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* **126**, 394-401 (2004).
60. Sargent, D.J. et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* **28**, 3219-26 (2010).
61. Sargent, D.J. & Hayes, D.F. Assessing the measure of a new drug: is survival the only thing that matters? *J Clin Oncol* **26**, 1922-3 (2008).
62. Tajima, A., Hess, M.T., Cabrera, B.L., Kolodner, R.D. & Carethers, J.M. The mismatch repair complex hMutS alpha recognizes 5-fluorouracil-modified DNA: implications for chemosensitivity and resistance. *Gastroenterology* **127**, 1678-84 (2004).
63. Meyers, M. et al. DNA mismatch repair-dependent response to fluoropyrimidine-generated damage. *J Biol Chem* **280**, 5516-26 (2005).
64. Fisher, S.A. et al. Combined evidence from three large British Association studies rejects TUCAN/CARD8 as an IBD susceptibility gene. *Gastroenterology* **132**, 2078-80 (2007).
65. Riccio, A. et al. The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability. *Nat Genet* **23**, 266-8 (1999).
66. Cortellino, S. et al. The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15071-6 (2003).
67. Sansom, O.J. et al. MBD4 deficiency reduces the apoptotic response to DNA-damaging agents in the murine small intestine. *Oncogene* **22**, 7130-6 (2003).
68. Wyatt, M.D. & Wilson, D.M., 3rd. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cell Mol Life Sci* **66**, 788-99 (2009).
69. Etienne-Grimaldi, M.C. et al. Molecular patterns in deficient mismatch repair colorectal tumours: results from a French prospective multicentric biological and genetic study. *Br J Cancer* **110**, 2728-37 (2014).
70. Tejpar S, B.F., Delorenzi M, Fiocca R, Yan P, Klingbiel D, Dietrich D, Van Cutsem E, Labianca R and Roth A. Microsatellite instability (MSI) in stage II and III colon cancer treated with 5FU-LV or 5FU-LV and irinotecan (PETACC 3-EORTC 40993-SAKK 60/00 trial). *Journal of Clinical Oncology* **27** (2009 ASCO Annual Meeting Proceedings).
71. Sinicrope, F.A. et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* **103**, 863-75 (2011).

72. de Gramont, A. et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* **18**, 2938-47 (2000).
73. Andre, T. et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* **27**, 3109-16 (2009).
74. Zaanan, A. et al. Chemotherapy of advanced small-bowel adenocarcinoma: a multicenter AGEO study. *Ann Oncol* **21**, 1786-93 (2010).
75. Des Guetz, G. et al. Prognostic impact of microsatellite instability in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX. *Anticancer Res* **30**, 4297-301 (2010).
76. Kim, S.T. et al. Clinical impact of microsatellite instability in colon cancer following adjuvant FOLFOX therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* **66**, 659-67 (2010).
77. Gavin, P.G. et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin Cancer Res* **18**, 6531-41 (2012).
78. Fink, D. et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* **56**, 4881-6 (1996).
79. Raymond, E., Chaney, S.G., Taamma, A. & Cvitkovic, E. Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol* **9**, 1053-71 (1998).
80. Aebi, S. et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* **56**, 3087-90 (1996).
81. Plumb, J.A., Strathdee, G., Sludden, J., Kaye, S.B. & Brown, R. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* **60**, 6039-44 (2000).
82. Scartozzi, M. et al. Mismatch repair system (MMR) status correlates with response and survival in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Lung Cancer* **53**, 103-9 (2006).
83. Sinicrope, F.A. et al. Prognostic impact of deficient DNA mismatch repair in patients with stage III colon cancer from a randomized trial of FOLFOX-based adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* **31**, 3664-72 (2013).
84. Fearon, E.R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-67 (1990).
85. Duval, A. & Hamelin, R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer research* **62**, 2447-54 (2002).
86. Markowitz, S. et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* **268**, 1336-8 (1995).
87. Wang, J. et al. Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem* **270**, 22044-9 (1995).
88. Parsons, R. et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* **55**, 5548-50 (1995).

89. Munoz, N.M. et al. Transforming growth factor beta receptor type II inactivation induces the malignant transformation of intestinal neoplasms initiated by Apc mutation. *Cancer Res* **66**, 9837-44 (2006).
90. Chang, D.K., Metzgar, D., Wills, C. & Boland, C.R. Microsatellites in the eukaryotic DNA mismatch repair genes as modulators of evolutionary mutation rate. *Genome Res* **11**, 1145-6 (2001).
91. Perucho, M. Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med* **2**, 630-1 (1996).
92. El-Bchiri, J. et al. Nonsense-mediated mRNA decay impacts MSI-driven carcinogenesis and anti-tumor immunity in colorectal cancers. *PLoS One* **3**, e2583 (2008).
93. Mori, Y. et al. Instabilotyping: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Res* **61**, 6046-9 (2001).
94. Woerner, S.M. et al. Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *Int J Cancer* **93**, 12-9 (2001).
95. Woerner, S.M. et al. SelTarbase, a database of human mononucleotide-microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology. *Nucleic Acids Res* **38**, D682-9 (2010).
96. Duval, A. et al. Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers. *Hum Mol Genet* **10**, 513-8 (2001).
97. Woerner, S.M. et al. Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes. *Oncogene* **22**, 2226-35 (2003).
98. Melo, S.A. et al. A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet* **41**, 365-70 (2009).
99. Melo, S.A. et al. A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell* **18**, 303-15 (2010).
100. Duval, A. et al. Target gene mutation profile differs between gastrointestinal and endometrial tumors with mismatch repair deficiency. *Cancer Res* **62**, 1609-12 (2002).
101. Kim, T.M., Laird, P.W. & Park, P.J. The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. *Cell* **155**, 858-68 (2013).
102. Dolcetti, R. et al. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* **154**, 1805-13 (1999).
103. Phillips, S.M. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic. *Br J Surg* **91**, 469-75 (2004).
104. Linnebacher, M. et al. Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int J Cancer* **93**, 6-11 (2001).
105. Schwitalle, Y. et al. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* **134**, 988-97 (2008).

106. Saeterdal, I. et al. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13255-60 (2001).
107. Mlecnik, B. et al. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* **138**, 1429-40 (2010).
108. Le Gouvello, S. et al. High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. *Gut* **57**, 772-9 (2008).
109. Oladipo, O. et al. The expression and prognostic impact of CXC-chemokines in stage II and III colorectal cancer epithelial and stromal tissue. *Br J Cancer* **104**, 480-7 (2011).
110. Boissiere-Michot, F. et al. Characterization of an adaptive immune response in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Oncoimmunology* **3**, e29256 (2014).
111. Pages, F. et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* **353**, 2654-66 (2005).
112. Galon, J. et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313**, 1960-4 (2006).
113. Pages, F. et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* **27**, 5944-51 (2009).
114. Hugo, H. et al. Mutations in the MYB intron I regulatory sequence increase transcription in colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer* **45**, 1143-54 (2006).
115. Biroccio, A. et al. c-Myb and Bcl-x overexpression predicts poor prognosis in colorectal cancer: clinical and experimental findings. *Am J Pathol* **158**, 1289-99 (2001).
116. Giannini, G. et al. Mutations of an intronic repeat induce impaired MRE11 expression in primary human cancer with microsatellite instability. *Oncogene* **23**, 2640-7 (2004).
117. Ejima, Y., Yang, L. & Sasaki, M.S. Aberrant splicing of the ATM gene associated with shortening of the intronic mononucleotide tract in human colon tumor cell lines: a novel mutation target of microsatellite instability. *Int J Cancer* **86**, 262-8 (2000).
118. Kim, H.S., Choi, S.I., Min, H.L., Kim, M.A. & Kim, W.H. Mutation at intronic repeats of the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) gene and ATM protein loss in primary gastric cancer with microsatellite instability. *PLoS One* **8**, e82769 (2013).
119. Suraweera, N. et al. Conservation of mononucleotide repeats within 3' and 5' untranslated regions and their instability in MSI-H colorectal cancer. *Oncogene* **20**, 7472-7 (2001).
120. Ghosh, S. & Jacobson, A. RNA decay modulates gene expression and controls its fidelity. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**, 351-61 (2010).
121. Garneau, N.L., Wilusz, J. & Wilusz, C.J. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 113-26 (2007).
122. Frischmeyer, P.A. et al. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* **295**, 2258-61 (2002).
123. Graille, M. & Seraphin, B. Surveillance pathways rescuing eukaryotic ribosomes lost in translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 727-35 (2012).

124. Isken, O. & Maquat, L.E. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* **21**, 1833-56 (2007).
125. Nicholson, P. & Muhlemann, O. Cutting the nonsense: the degradation of PTC-containing mRNAs. *Biochem Soc Trans* **38**, 1615-20 (2010).
126. Losson, R. & Lacroute, F. Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5134-7 (1979).
127. Chang, Y.F., Imam, J.S. & Wilkinson, M.F. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* **76**, 51-74 (2007).
128. Frischmeyer, P.A. & Dietz, H.C. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* **8**, 1893-900 (1999).
129. Kervestin, S. & Jacobson, A. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 700-12 (2012).
130. Hall, G.W. & Thein, S. Nonsense codon mutations in the terminal exon of the beta-globin gene are not associated with a reduction in beta-mRNA accumulation: a mechanism for the phenotype of dominant beta-thalassemia. *Blood* **83**, 2031-7 (1994).
131. Neu-Yilik, G. et al. Mechanism of escape from nonsense-mediated mRNA decay of human beta-globin transcripts with nonsense mutations in the first exon. *RNA* **17**, 843-54 (2011).
132. Slayton, R.L., Deschenes, S.P. & Willing, M.C. Nonsense mutations in the COL1A1 gene preferentially reduce nuclear levels of mRNA but not hnRNA in osteogenesis imperfecta type I cell strains. *Matrix Biol* **19**, 1-9 (2000).
133. Niyibizi, C., Wang, S., Mi, Z. & Robbins, P.D. Gene therapy approaches for osteogenesis imperfecta. *Gene Ther* **11**, 408-16 (2004).
134. Kerr, T.P., Sewry, C.A., Robb, S.A. & Roberts, R.G. Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum Genet* **109**, 402-7 (2001).
135. Keeling, K.M. & Bedwell, D.M. Suppression of nonsense mutations as a therapeutic approach to treat genetic diseases. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 837-52 (2011).
136. Holbrook, J.A., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W. & Kulozik, A.E. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* **36**, 801-8 (2004).
137. Wilkinson, M.F. A new function for nonsense-mediated mRNA-decay factors. *Trends Genet* **21**, 143-8 (2005).
138. Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O.M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G.M. & Mazoyer, S. The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum Mol Genet* **11**, 2805-14 (2002).
139. Fearnhead, N.S., Britton, M.P. & Bodmer, W.F. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* **10**, 721-33 (2001).
140. Fearon, E.R. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* **6**, 479-507 (2011).
141. Karam, R. et al. The NMD mRNA surveillance pathway downregulates aberrant E-cadherin transcripts in gastric cancer cells and in CDH1 mutation carriers. *Oncogene* **27**, 4255-60 (2008).
142. Kaurah, P. et al. Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA* **297**, 2360-72 (2007).

143. Mort, M., Ivanov, D., Cooper, D.N. & Chuzhanova, N.A. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum Mutat* **29**, 1037-47 (2008).
144. Wang, D. et al. Inhibition of nonsense-mediated RNA decay by the tumor microenvironment promotes tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **31**, 3670-80 (2011).
145. Ye, J. et al. The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J* **29**, 2082-96 (2010).
146. Ganapathy, V., Thangaraju, M. & Prasad, P.D. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther* **121**, 29-40 (2009).
147. Gao, P. et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* **458**, 762-5 (2009).
148. Liu, C. et al. The UPF1 RNA surveillance gene is commonly mutated in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Med* **20**, 596-8 (2014).
149. Noensie, E.N. & Dietz, H.C. A strategy for disease gene identification through nonsense-mediated mRNA decay inhibition. *Nat Biotechnol* **19**, 434-9 (2001).
150. Ionov, Y., Nowak, N., Perucho, M., Markowitz, S. & Cowell, J.K. Manipulation of nonsense mediated decay identifies gene mutations in colon cancer Cells with microsatellite instability. *Oncogene* **23**, 639-45 (2004).
151. Ivanov, I., Lo, K.C., Hawthorn, L., Cowell, J.K. & Ionov, Y. Identifying candidate colon cancer tumor suppressor genes using inhibition of nonsense-mediated mRNA decay in colon cancer cells. *Oncogene* **26**, 2873-84 (2007).
152. El-Bchiri, J. et al. Differential nonsense mediated decay of mutated mRNAs in mismatch repair deficient colorectal cancers. *Hum Mol Genet* **14**, 2435-42 (2005).
153. Shin, N. et al. Identification of frequently mutated genes with relevance to nonsense mediated mRNA decay in the high microsatellite instability cancers. *Int J Cancer* **128**, 2872-80 (2011).
154. Gilboa, E. Expression of new antigens on tumor cells by inhibiting nonsense-mediated mRNA decay. *Immunol Res* **57**, 44-51 (2013).
155. Pastor, F., Kolonias, D., Giangrande, P.H. & Gilboa, E. Induction of tumour immunity by targeted inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **465**, 227-30 (2010).
156. Williams, D.S. et al. Nonsense mediated decay resistant mutations are a source of expressed mutant proteins in colon cancer cell lines with microsatellite instability. *PLoS One* **5**, e16012 (2010).
157. F, R. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571-573 (1962).
158. Lindquist, S. & Craig, E.A. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* **22**, 631-77 (1988).
159. Kampinga, H.H. et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* **14**, 105-11 (2009).
160. Ciocca, D.R. & Calderwood, S.K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* **10**, 86-103 (2005).

161. Calderwood, S.K., Khaleque, M.A., Sawyer, D.B. & Ciocca, D.R. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* **31**, 164-72 (2006).
162. Rappa, F. et al. HSP-molecular chaperones in cancer biogenesis and tumor therapy: an overview. *Anticancer Res* **32**, 5139-50 (2012).
163. Wang, H., Tan, M.S., Lu, R.C., Yu, J.T. & Tan, L. Heat shock proteins at the crossroads between cancer and Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* **2014**, 239164 (2014).
164. Ciocca, D.R., Arrigo, A.P. & Calderwood, S.K. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol* **87**, 19-48 (2013).
165. Joly, A.L., Wettstein, G., Mignot, G., Ghiringhelli, F. & Garrido, C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun* **2**, 238-47 (2010).
166. Beere, H.M. Stressed to death: regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins. *Sci STKE* **2001**, re1 (2001).
167. Garrido, C. et al. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* **5**, 2592-601 (2006).
168. Pandey, P. et al. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* **19**, 4310-22 (2000).
169. Zhang, R. et al. Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene* **24**, 3954-63 (2005).
170. Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L. & Kroemer, G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 433-42 (2001).
171. Hsu, A.L., Murphy, C.T. & Kenyon, C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* **300**, 1142-5 (2003).
172. Tatar, M., Khazaeli, A.A. & Curtsinger, J.W. Chaperoning extended life. *Nature* **390**, 30 (1997).
173. Workman, P. Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone. *Trends Mol Med* **10**, 47-51 (2004).
174. Maxwell, P.H., Pugh, C.W. & Ratcliffe, P.J. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 293-9 (2001).
175. Neckers, L. & Ivy, S.P. Heat shock protein 90. *Curr Opin Oncol* **15**, 419-24 (2003).
176. Sun, J. & Liao, J.K. Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 2238-44 (2004).
177. Pfosser, A. et al. Liposomal Hsp90 cDNA induces neovascularization via nitric oxide in chronic ischemia. *Cardiovasc Res* **65**, 728-36 (2005).
178. Sanderson, S. et al. Benzoquinone ansamycin heat shock protein 90 inhibitors modulate multiple functions required for tumor angiogenesis. *Mol Cancer Ther* **5**, 522-32 (2006).
179. Keezer, S.M. et al. Angiogenesis inhibitors target the endothelial cell cytoskeleton through altered regulation of heat shock protein 27 and cofilin. *Cancer Res* **63**, 6405-12 (2003).

180. Schmitt, E., Gehrmann, M., Brunet, M., Multhoff, G. & Garrido, C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* **81**, 15-27 (2007).
181. Tsutsumi, S. & Neckers, L. Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci* **98**, 1536-9 (2007).
182. Stellas, D., Karameris, A. & Patsavoudi, E. Monoclonal antibody 4C5 immunostains human melanomas and inhibits melanoma cell invasion and metastasis. *Clin Cancer Res* **13**, 1831-8 (2007).
183. Eustace, B.K. et al. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol* **6**, 507-14 (2004).
184. Snigireva, A.V., Vrublevskaya, V.V., Skarga, Y.Y., Evdokimovskaya, Y.V. & Morenkov, O.S. Effect of heat shock protein 90 (Hsp90) on migration and invasion of human cancer cells in vitro. *Bull Exp Biol Med* **157**, 476-8 (2014).
185. Zhao, L. et al. Differential proteomic analysis of human colorectal carcinoma cell lines metastasis-associated proteins. *J Cancer Res Clin Oncol* **133**, 771-82 (2007).
186. Wu, C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 441-69 (1995).
187. Akerfelt, M., Morimoto, R.I. & Sistonen, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 545-55 (2010).
188. Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D.F. & Voellmy, R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* **94**, 471-80 (1998).
189. Khaleque, M.A. et al. Induction of heat shock proteins by heregulin beta1 leads to protection from apoptosis and anchorage-independent growth. *Oncogene* **24**, 6564-73 (2005).
190. Taira, T. et al. Cell cycle-dependent switch of up-and down-regulation of human hsp70 gene expression by interaction between c-Myc and CBF/NF-Y. *J Biol Chem* **274**, 24270-9 (1999).
191. Agoff, S.N., Hou, J., Linzer, D.I. & Wu, B. Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science* **259**, 84-7 (1993).
192. Ghioni, P. et al. Complex transcriptional effects of p63 isoforms: identification of novel activation and repression domains. *Mol Cell Biol* **22**, 8659-68 (2002).
193. Langdon, S.P. et al. Expression of the heat shock protein HSP27 in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **1**, 1603-9 (1995).
194. Cappello, F. et al. The expression of HSP60 and HSP10 in large bowel carcinomas with lymph node metastase. *BMC Cancer* **5**, 139 (2005).
195. Cappello, F., Rappa, F., David, S., Anzalone, R. & Zummo, G. Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, HSP60, HSP10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis. *Anticancer Res* **23**, 1325-31 (2003).
196. Nanbu, K. et al. Expression of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas. Correlation with clinicopathology, sex steroid receptor status, and p53 protein expression. *Cancer* **77**, 330-8 (1996).

197. Lazaris, A. et al. Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. *Breast Cancer Res Treat* **43**, 43-51 (1997).
198. Maehara, Y. et al. Overexpression of the heat shock protein HSP70 family and p53 protein and prognosis for patients with gastric cancer. *Oncology* **58**, 144-51 (2000).
199. Pick, E. et al. High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res* **67**, 2932-7 (2007).
200. Cappello, F. et al. 60KDa chaperonin (HSP60) is over-expressed during colorectal carcinogenesis. *Eur J Histochem* **47**, 105-10 (2003).
201. Cappello, F. et al. Hsp60: molecular anatomy and role in colorectal cancer diagnosis and treatment. *Front Biosci (Schol Ed)* **3**, 341-51 (2011).
202. He, Y. et al. Proteomics-based identification of HSP60 as a tumor-associated antigen in colorectal cancer. *Proteomics Clin Appl* **1**, 336-42 (2007).
203. Bauer, K. et al. High HSP27 and HSP70 expression levels are independent adverse prognostic factors in primary resected colon cancer. *Cell Oncol (Dordr)* **35**, 197-205 (2012).
204. Kocsis, J., Madaras, B., Toth, E.K., Fust, G. & Prohaszka, Z. Serum level of soluble 70-kD heat shock protein is associated with high mortality in patients with colorectal cancer without distant metastasis. *Cell Stress Chaperones* **15**, 143-51 (2010).
205. Lazaris, A.C. et al. Heat shock protein 70 and HLA-DR molecules tissue expression. Prognostic implications in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* **38**, 739-45 (1995).
206. Wang, X.P., Qiu, F.R., Liu, G.Z. & Chen, R.F. Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human colonic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* **11**, 1056-9 (2005).
207. Banerjea, A. et al. Immunogenic hsp-70 is overexpressed in colorectal cancers with high-degree microsatellite instability. *Dis Colon Rectum* **48**, 2322-8 (2005).
208. Banerjea, A. et al. Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. *Mol Cancer* **3**, 21 (2004).
209. Noessner, E. et al. Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *J Immunol* **169**, 5424-32 (2002).
210. Drecoll, E. et al. Expression analysis of heat shock protein 90 (HSP90) and Her2 in colon carcinoma. *Int J Colorectal Dis* **29**, 663-71 (2014).
211. Chen, W.S., Lee, C.C., Hsu, Y.M., Chen, C.C. & Huang, T.S. Identification of heat shock protein 90alpha as an IMH-2 epitope-associated protein and correlation of its mRNA overexpression with colorectal cancer metastasis and poor prognosis. *Int J Colorectal Dis* **26**, 1009-17 (2011).
212. Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G. & Neckers, L. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 537-49 (2010).
213. Mimnaugh, E.G. et al. Simultaneous inhibition of hsp 90 and the proteasome promotes protein ubiquitination, causes endoplasmic reticulum-derived cytosolic vacuolization, and enhances antitumor activity. *Mol Cancer Ther* **3**, 551-66 (2004).

214. Richardson, P.G. et al. Tanespimycin with bortezomib: activity in relapsed/refractory patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* **150**, 428-37 (2010).
215. Daugaard, M., Jaattela, M. & Rohde, M. Hsp70-2 is required for tumor cell growth and survival. *Cell Cycle* **4**, 877-80 (2005).
216. Easton, D.P., Kaneko, Y. & Subject, J.R. The hsp110 and Grp1 70 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones* **5**, 276-90 (2000).
217. Yam, A.Y., Albanese, V., Lin, H.T. & Frydman, J. Hsp110 cooperates with different cytosolic HSP70 systems in a pathway for de novo folding. *J Biol Chem* **280**, 41252-61 (2005).
218. Shaner, L., Wegele, H., Buchner, J. & Morano, K.A. The yeast Hsp110 Sse1 functionally interacts with the Hsp70 chaperones Ssa and Ssb. *J Biol Chem* **280**, 41262-9 (2005).
219. Albanese, V., Yam, A.Y., Baughman, J., Parnot, C. & Frydman, J. Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell* **124**, 75-88 (2006).
220. Mandal, A.K. et al. Hsp110 chaperones control client fate determination in the hsp70-Hsp90 chaperone system. *Mol Biol Cell* **21**, 1439-48 (2010).
221. Dragovic, Z., Broadley, S.A., Shomura, Y., Bracher, A. & Hartl, F.U. Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J* **25**, 2519-28 (2006).
222. Raviol, H., Sadlish, H., Rodriguez, F., Mayer, M.P. & Bukau, B. Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor. *EMBO J* **25**, 2510-8 (2006).
223. Polier, S., Dragovic, Z., Hartl, F.U. & Bracher, A. Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. *Cell* **133**, 1068-79 (2008).
224. Schuermann, J.P. et al. Structure of the Hsp110:Hsc70 nucleotide exchange machine. *Mol Cell* **31**, 232-43 (2008).
225. Andreasson, C., Fiaux, J., Rampelt, H., Druffel-Augustin, S. & Bukau, B. Insights into the structural dynamics of the Hsp110-Hsp70 interaction reveal the mechanism for nucleotide exchange activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16519-24 (2008).
226. Oh, H.J., Chen, X. & Subject, J.R. Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance. *J Biol Chem* **272**, 31636-40 (1997).
227. Goeckeler, J.L., Stephens, A., Lee, P., Caplan, A.J. & Brodsky, J.L. Overexpression of yeast Hsp110 homolog Sse1p suppresses ydj1-151 thermosensitivity and restores Hsp90-dependent activity. *Mol Biol Cell* **13**, 2760-70 (2002).
228. Sadlish, H. et al. Hsp110 chaperones regulate prion formation and propagation in *S. cerevisiae* by two discrete activities. *PLoS One* **3**, e1763 (2008).
229. Hrizo, S.L. et al. The Hsp110 molecular chaperone stabilizes apolipoprotein B from endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). *J Biol Chem* **282**, 32665-75 (2007).
230. Manjili, M.H. et al. Development of a recombinant HSP110-HER-2/neu vaccine using the chaperoning properties of HSP110. *Cancer Res* **62**, 1737-42 (2002).

231. Wang, X.Y., Kazim, L., Repasky, E.A. & Subject, J.R. Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity. *J Immunol* **166**, 490-7 (2001).
232. Colgan, S.P. et al. Intestinal heat shock protein 110 regulates expression of CD1d on intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* **112**, 745-54 (2003).
233. Olszak, T. et al. Protective mucosal immunity mediated by epithelial CD1d and IL-10. *Nature* **509**, 497-502 (2014).
234. Zappasodi, R. et al. Serological identification of HSP105 as a novel non-Hodgkin lymphoma therapeutic target. *Blood* **118**, 4421-30 (2011).
235. Slaby, O. et al. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncol Rep* **21**, 1235-41 (2009).
236. Hwang, T.S. et al. Differential, stage-dependent expression of Hsp70, Hsp110 and Bcl-2 in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* **18**, 690-700 (2003).
237. Kai, M. et al. Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol Rep* **10**, 1777-82 (2003).
238. Gotoh, K. et al. Apg-2 has a chaperone-like activity similar to Hsp110 and is overexpressed in hepatocellular carcinomas. *FEBS Lett* **560**, 19-24 (2004).
239. Ceballos, E. et al. Inhibitory effect of c-Myc on p53-induced apoptosis in leukemia cells. Microarray analysis reveals defective induction of p53 target genes and upregulation of chaperone genes. *Oncogene* **24**, 4559-71 (2005).
240. Hosaka, S. et al. Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces apoptosis of various cancer cells both in vitro and in vivo. *Cancer Sci* **97**, 623-32 (2006).
241. Yamagishi, N., Ishihara, K., Saito, Y. & Hatayama, T. Hsp105 family proteins suppress staurosporine-induced apoptosis by inhibiting the translocation of Bax to mitochondria in HeLa cells. *Exp Cell Res* **312**, 3215-23 (2006).
242. Nakajima, M. et al. Prognostic significance of heat shock protein 110 expression and T lymphocyte infiltration in esophageal cancer. *Hepatogastroenterology* **58**, 1555-60 (2011).
243. Yamagishi, N., Fujii, H., Saito, Y. & Hatayama, T. Hsp105beta upregulates hsp70 gene expression through signal transducer and activator of transcription-3. *FEBS J* **276**, 5870-80 (2009).
244. Meng, W. et al. A clinical evaluation of amlexanox oral adhesive pellicles in the treatment of recurrent aphthous stomatitis and comparison with amlexanox oral tablets: a randomized, placebo controlled, blinded, multicenter clinical trial. *Trials* **10**, 30 (2009).
245. Gonzalez-Hilarion, S. et al. Rescue of nonsense mutations by amlexanox in human cells. *Orphanet J Rare Dis* **7**, 58 (2012).
246. Kim, J.H. et al. Expression status of wild-type HSP110 correlates with HSP110 T17 deletion size and patient prognosis in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Mod Pathol* **27**, 443-53 (2014).
247. Reilly, S.M. et al. An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK-varepsilon improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice. *Nat Med* **19**, 313-21 (2013).

- 248. Durand, S. et al. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *J Cell Biol* **178**, 1145-60 (2007).
- 249. Pavelitz, T. et al. MRE11-Deficiency Associated with Improved Long-Term Disease Free Survival and Overall Survival in a Subset of Stage III Colon Cancer Patients in Randomized CALGB 89803 Trial. *PLoS One* **9**, e108483 (2014).

ANNEXE

Extensive characterization of sphere models established from colorectal cancer cell lines

Ada Collura · Laetitia Marisa · Diletta Trojan · Olivier Buhard ·
Anaïs Lagrange · Arnaud Saget · Marianne Bombled · Patricia Méchighel ·
Mira Ayadi · Martine Muleris · Aurélien de Reynies · Magali Svrcek ·
Jean-François Fléjou · Jean-Claude Florent · Florence Mahuteau-Betzer ·
Anne-Marie Faussat · Alex Duval

Received: 27 May 2012/Revised: 3 September 2012/Accepted: 4 September 2012/Published online: 25 September 2012
© Springer Basel AG 2012

Abstract Links between cancer and stem cells have been proposed for many years. As the cancer stem cell (CSC) theory became widely studied, new methods were developed to culture and expand cancer cells with conserved determinants of “stemness”. These cells show increased ability to grow in suspension as spheres in serum-free medium supplemented with growth factors and chemicals. The physiological relevance of this phenomenon in established cancer cell lines remains unclear. Cell lines have traditionally been used to explore tumor biology and serve as preclinical models for the screening of potential therapeutic agents. Here, we grew cell-forming spheres (CFS) from 25 established colorectal cancer cell lines. The molecular and cellular characteristics of CFS were compared to the bulk of tumor cells. CFS could be isolated from 72 % of the cell lines. Both CFS and their parental

CRC cell lines were highly tumorigenic. Compared to their parental cells, they showed similar expression of putative CSC markers. The ability of CRC cells to grow as CFS was greatly enhanced by prior treatment with 5-fluorouracil. At the molecular level, CFS and parental CRC cells showed identical gene mutations and very similar genomic profiles, although microarray analysis revealed changes in CFS gene expression that were independent of DNA copy-number. We identified a CFS gene expression signature common to CFS from all CRC cell lines, which was predictive of disease relapse in CRC patients. In conclusion, CFS models derived from CRC cell lines possess interesting phenotypic features that may have clinical relevance for drug resistance and disease relapse.

Keywords Colorectal cancer · Colon cancer cell lines · Spheres · Microarray

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00018-012-1160-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Collura · D. Trojan · O. Buhard · A. Lagrange · A. Saget ·
P. Méchighel · M. Muleris · M. Svrcek · J.-F. Fléjou · A. Duval
Inserm, UMRS_938, Centre de Recherche Saint-Antoine,
Equipe “Instabilité des Microsatellites et Cancers”,
75012 Paris, France

A. Collura · D. Trojan · O. Buhard · A. Lagrange · A. Saget ·
P. Méchighel · M. Muleris · M. Svrcek · J.-F. Fléjou ·
A.-M. Faussat · A. Duval
Université Pierre et Marie Curie-Paris6, Paris, France

L. Marisa · M. Ayadi · A. de Reynies
Programme “Cartes d’Identité des Tumeurs”,
Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France

M. Bombled · J.-C. Florent · F. Mahuteau-Betzer
UMR 176 CNRS/Institut Curie, Université Paris-Sud,
Orsay, France

M. Svrcek · J.-F. Fléjou
AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d’Anatomie et Cytologie
Pathologiques, Paris, France

M. Svrcek · J.-F. Fléjou
AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Tumorothèque CancerEst,
75012 Paris, France

A. Collura (✉) · A. Duval (✉)
INSERM UMRS 938 Team “Microsatellite Instability and
Cancer”, Hôpital Saint-Antoine, 184, rue du Faubourg
Saint-Antoine, 75571 Paris cedex 12, France
e-mail: ada.collura@inserm.fr

A. Duval
e-mail: alex.duval@inserm.fr

Abbreviations

5-FU	5-Fluorouracil
CFS	Cell-forming-spheres
CIN	Chromosomal instability
CRC	Colorectal cancer
CSC	Cancer stem cells
DFS	Disease-free survival
MMR	Mismatch-repair
MSI	Microsatellite instability
MSS	Microsatellite stability

Introduction

The cancer stem cell (CSC) theory has generated much interest in both the research and clinical communities, notably for colorectal cancer (CRC) [1–3]. According to this hierarchical model, CSCs are defined by their ability to self-renew indefinitely, while also being able to differentiate and generate both tumorigenic and non-tumorigenic daughter cells that constitute the bulk of the tumor [4]. CSCs are thought to have a low rate of division and proliferation that helps them resist various chemotherapies and radiation. Both these forms of treatment preferentially affect highly proliferative cells, thus potentially making CSCs a major reason for the failure of anticancer treatment [5]. In tumors including CRC, the presence and survival of CSCs has been suggested as a key mechanism underlying chemoresistance and disease relapse [6, 7]. This original interpretation of the CSC theory has recently been challenged, however. Some authors have highlighted the plasticity of the CSC phenotype and suggested that it could be induced through dedifferentiation processes influenced by the tumor cell environment [8].

Cancer cell lines have been widely used to explore tumor biology and as preclinical models for the screening of potential therapeutic agents. They are a valuable resource that can be used repeatedly and have also been well characterized with respect to mutational and gene expression profiles [9]. Similar frequencies of gene mutation have been reported in primary tumors and in cancer cell lines derived from the same primary site. Cancer cell lines are not contaminated with stromal tissue, which can sometimes affect the interpretation of data obtained from primary tumors [10]. Furthermore, cancer cell lines often faithfully represent the tumor from which they were isolated [11, 12]. It remains to be determined whether cancer cell lines are relevant biological tools to study the role of CSCs in tumorigenesis. A number of authors have hypothesized the existence of cancer stem-like cells in these cellular models [13, 14]; however, their phenotype is still poorly characterized. Moreover, it is not known

whether cancer stem-like cells from cell lines have any clinical relevance [15, 16].

In order to study cells from cancer cell lines that could display a stem-like phenotype, the first requirement is to have a system in which they can be propagated. The ability to grow in suspension as spheres in serum-free medium supplemented with specific growth factors and chemicals has been described for the expansion of neuronal stem cells [17]. Sphere culture has also been proposed as a valuable method for isolating cancer cells with conserved stemness determinants that are able to propagate in defined media [18–21]. In the present study, we have used this method to grow cell-forming spheres (CFS) from a panel of 25 CRC cell lines. These cell lines were selected to reflect the heterogeneity of CRC in terms of showing microsatellite stability (MSS) or instability (MSI). CRC is a complex tumor entity that includes distinctive molecular phenotypes associated with different clinical features, including response to chemotherapy [22–24]. We investigated the cellular and molecular phenotypes of CFS derived from this panel of CRC cell lines, with particular reference to treatment resistance and CSC features.

Materials and methods

Tissue collection and preparation of xenografts

Human colon tissue fragments were obtained in accordance with the ethical standards of the institutional committee on human experimentation from 15 patients undergoing a colon resection for CRC at the Saint-Antoine hospital in Paris. A biobank collection of 30 tumors stored at -80°C was used to obtain fresh tumor tissue after engraftment in 5-week-old female nude mice (nu/nu). Tumor implantation procedures were performed as previously described [38]. Twelve tumor xenografts were grown for between 1 and 4 months after engraftment. Cancer tissues were intensively washed four times in PBS solution containing antibiotics and then incubated overnight in DMEM/F12 (PAA) containing penicillin (500 U/ml), streptomycin (500 $\mu\text{g/ml}$), amphotericin B (0.25 $\mu\text{g/ml}$), and ceftazidime (50 $\mu\text{g/ml}$). Enzymatic digestion was performed using collagenase (1.5 mg/ml; Sigma) and hyaluronidase (20 $\mu\text{g/ml}$; Sigma) in PBS for 1 h. These digests were used for FACS analysis.

Cell culture

Colon cancer cell lines were cultured in DMEM media supplemented with 10 % FCS (20 % for Caco-2 cell line), 100 U/ml penicillin G, and 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin. For the culture of CFS, cell lines were grown in serum-free

DMEM/F12 media supplemented with 100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin, 6 g/l glucose, 1 mg/ml NaHCO₃, 5 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 4 µg/ml Heparin, 4 mg/ml BSA, 60 mmol/l putrescine, 20 nmol/l progesterone, 30 nmol/l sodium selenite, 25 µg/ml, insulin, 100 µg/ml apo-transferrin, and human recombinant EGF and FGF-2 (Sigma), both at a final concentration of 20 µg/ml (sphere-medium).

CFS formation assay

The CFS capacity of colon cancer cell lines tested in this study was derived from monolayer culture or floating culture (for Colo320 colon cancer cell line). It was assessed by plating 2×10^5 cells in a T25 flask (8,000 cells/cm²). In CFS^{Positive} cell lines, CFS were observed 3–7 days after plating. To obtain pure CSC-like cells, the culture period in sphere-medium was extended to 10 passages. To evaluate the CFS capacity of sorted CD166⁺CD44⁺EpCAM^{high} or CD166⁻CD44⁻EpCAM^{low} HCT116 cell subpopulations (see Fig. 4c, below), 1,000 cells/well were plated in 96-well culture dishes in 200 µl of sphere-medium. The number of CFS in each well was evaluated after 5 days.

Proliferation and chemosensitivity assay

Rates of proliferation and sensitivity to 5-FU were assessed using the cell proliferation reagent WST-1 (Roche). Briefly, 10⁴ cells of each cell line or from CFS cultures were plated per well in 24-well plates in 2 ml of media with or without 5-FU. After 5 days, WST-1 reagent was added at a 1:10 final dilution and incubated for 4 h at 37 °C. The relative survival fraction of cells was compared between treated and untreated cells.

CFS assay following 5-FU treatment

Inoculation of 2×10^6 cells into a T75 flask was made with different concentrations of 5-FU to obtain 10 % cell survival after 5 days of incubation. Cells were then washed detached and 10⁵ cells were inoculated into a T25 flask with sphere-medium (4,000 cells/cm²). After 3 days observation, photographs were taken to determine the proportion of CFS amongst the 5-FU resistant cells. For experimental controls, untreated cells were plated at the same concentration in sphere-medium.

Chemical screening

The multi-step strategy used to screen the Institut Curie/CNRS chemical library is shown in Fig. 3a (see below). This bank contains 8,560 compounds in a 96-well format at 10 mg/ml in DMSO (i.e. mean concentration 10 mM). Screening was

performed at 10 and 1 µM final concentrations in 96-well plates and in a final volume of 200 µl of medium. CRC cell lines were incubated with the chemical bank at 700 cells/well for 5 days in standard culture conditions. The Wst-1 assay was used to indirectly estimate cell survival according to the indicated procedure (Roche). Confirmation of the 15 compounds (validation step) was obtained by starting with drug powders in order to reach the correct initial concentration and then performing a cell survival test in 24-well plates with 2 ml of medium. CRC cell lines and CFS were incubated with the chemical bank at 700 and 1,500 cells/well, respectively, for 5 days in standard culture conditions.

Subcutaneous transplantation of colon cancer cell lines

Colon cancer cell lines and CFS were suspended in 200 µl PBS-Matrigel (1:1) mixture. They were injected subcutaneously in the flank of 5-week-old nude mice (nu/nu; 1 injection/flank). Experiments were performed in triplicates (3 mice/each sample). Tumor formation was evaluated using a caliper starting on the third week after injection and then weekly for 4 weeks. Animals were sacrificed when the tumor size was between 15 and 20 mm in diameter, or 7 weeks after the injection.

Microsatellite analysis

Non-coding microsatellite repeat markers were used to detect instability in five microsatellites (NR27, NR21, NR24, Bat25, and Bat26 comprising the pentaplex PCR system) in CRC cell lines and their CFS counterparts, as previously described [39]. The *TGFBR2*, *BAX*, *MSH3*, and *MSH6* genes containing coding repeats were amplified as previously described [40]. Four other genes containing coding mononucleotide repeat were also amplified with specific primers (sequences available on request). Amplified PCR products were run on an Applied Biosystems PRISM 3100 Genetic Analyzer automated capillary electrophoresis DNA sequencer. Allelic sizes were estimated using gene mapper software (Applied Biosystems).

RNA and DNA extraction

Total RNA from CFS and CRC cell lines was extracted using Trizol (Invitrogen) and DNA was extracted using a standard phenol–chloroform procedure. Both RNA and DNA were assessed for integrity and quantity following stringent quality control criteria (CIT program protocols <http://cit.ligue-cancer.net>).

Flow cytometry

Flow cytometry was performed on adherent cell lines or CFS cultures after dissociation with accutase (PAA). Cells

were washed once in PBS supplemented with 1 % BSA (Sigma) and resuspended in PBS/1 % BSA at a concentration of 10^6 cells/100 μ l. Cells were stained with IgG-PE/PECy5/FITC/APC (BD Biosciences) to detect non-specific binding of antibodies and autofluorescence. Primary antibodies used were: CD44-FITC 1:75 (clone G44-26; BD Biosciences), CD133-PE 1:100 (clone AC133; Miltenyi Biotec), EpCAM-APC 1:200 (clone HEA-125; Miltenyi Biotec), CD24-FITC 1:100 (clone ML5; BD Biosciences) and CD29-PECy5 1:100 (clone MAR4; BD Biosciences). Cells were incubated for 30 min at 4 °C in the dark and then washed in buffer (PBS, 1 % BSA, 1 mM EDTA). Expression of cell surface markers was detected with a FACSscan flow cytometer (BD Biosciences). Cell line suspensions were sorted according to their CD166 and/or CD44 and/or EpCAM expression with a FACS Coulter (BD Biosciences). Separated subpopulations were reanalyzed for purity.

Genomic and gene expression arrays and analysis

Data preparation

Gene expression analysis using arrays was carried out on the IGBMC microarray platform (Strasbourg, France). Total RNA was amplified, labeled, and hybridized to Affymetrix Human Genome U133 plus2 GeneChips following the manufacturer's protocol (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). The chips were scanned with the Affymetrix GeneChip Scanner 3000 and raw intensities were quantified from subsequent images using GCOS 1.4 software (Affymetrix). Data were normalized using the Robust Multi-array Average method and implemented in the R package *affy* [41].

Genomic arrays were performed on the Integrage Platform (Evry, France). DNAs from 13 CFS/adherent cell lines (i.e. LIM2405, HCT8, HCT116, HCT15, TC-7, CO115, RKO, LS411, V9P, HT29, SW620, Colo320, FET) were hybridized on IlluminaSNP HumanCNV610 chips according to instructions provided by the array manufacturer (Illumina, San Diego, CA, USA). Data were normalized and processed as described in supplemental methods [42]. Data are available in the ArrayExpress database (www.ebi.ac.uk/arrayexpress).

All analyses were performed using R software (<http://www.R-project.org>)

Unsupervised analysis of gene expression data

To evaluate the distance between CRC cell lines and CFS, PCA and consensus hierarchical clustering analysis of the 13 pairs (26 samples) were performed on probe-sets present [\log_2 intensity $> \log_2(3.5)$] in at least 5 % of the samples

and having a robust coefficient of variation significantly different from the median variance of all probe sets ($rCV > 0.05$ and P value variance test < 0.01).

CFS signature

Genes differentially expressed between CRC cell lines and CFS were assessed using Limma paired moderated t test [43]. Genes having a P value < 0.001 define the CFS signature ($n = 359$ probe sets).

CFS functional analysis

All KEGG pathways and gene sets functionally related to stemness from KEGG, Biocarta, GeneOntology, Molecular Signatures database and Stanford Microarray database were tested for enrichment of up- and down-regulated genes in CFS. Enrichment of the top 100–500 up/down deregulated probe sets was evaluated by computing a hypergeometric test. The median P value across up/down top probe set lists was used to select pathways and gene sets of interest (P value < 0.05).

Analysis of deregulated regions

To define up/down regulation regions separately for each CFS/CRC cell line pair, the genome was segmented into overlapping windows of 5 Mb. In each window, the enrichment of up- or down-regulated genes ($\log_2(FC) > 0.5$) for the given pair was assessed by a Fisher test between up/down genes in the windows and up/down regulated genes in the rest of the genome. To compute the frequency across pairs, each region was assigned -1 (down-regulated)/0 (not modified)/1 (up-regulated) depending on the significance (P value < 0.05) of the enrichment.

Survival analysis

Two publicly available Affymetrix U133P2 datasets with Recurrence Free Survival annotations were used: [25] dataset GSE17536 and GSE17537 comprising 148 samples of Stage II/III CRC), and [26] GSE14333 comprising 99 samples of Stage B and C CRC not contained in the previous dataset. These were normalized by RMA and by clinical center. To evaluate the survival impact of the CFS signature in those datasets, a subset of genes from the original signature (see Supplementary Table S1) was selected based upon their high fold-change [$|\log_2(CFS/cell\ line)| > 0.8$; $n = 55$]. To define a prognostic CFS signature, the 55-gene signature was reduced to probe sets significantly associated with prognosis in the first dataset using univariate Cox models (\log rank P value < 0.05 ; $n = 8$). For both CFS signatures, an average expression score per sample was then defined. Normalized intensity values of

selected genes were each centered to zero by subtracting the median expression of each gene. Genes that were down-regulated in CFS were multiplied by (-1) , thus both up- and down-regulated genes can be used in the score. All genes from the given signature were then averaged. A higher score corresponded to a higher deregulation of CSF genes. The score was then divided into high and low score groups by taking tails of the score distribution in the considered dataset, i.e. 30 % of the highest and 30 % of the lowest scores.

Survival curves were calculated according to the Kaplan–Meier method with an end-point at 5 years. Differences between curves were assessed using the log-rank test. Univariate and multivariate associations for outcome were performed using the Cox regression model.

Results

The ability of CRC cell lines to grow as CFS in serum-free medium enriched with growth factors and chemical supplements is highly variable

We tested the ability of established MSI and MSS CRC cell lines ($n = 25$) to grow as CFS in sphere-medium. CFS were obtained from 10 MSI and 8 MSS cell lines (total 18/25, 72 %) (Fig. 1a). In the remaining 7 CRC cell lines (4 MSI, 3 MSS), a small number of cells remained afloat but died after 1–4 passages (1–6 weeks) in sphere-medium (data not shown). Morphologically, the CFS were quite heterogeneous and ranged from densely packed spheres with almost indiscernible individual cells to more loosely packed spheres or individual floating cells (Fig. 1b).

CFS display identical clonal genomic alterations to their parental CRC cells

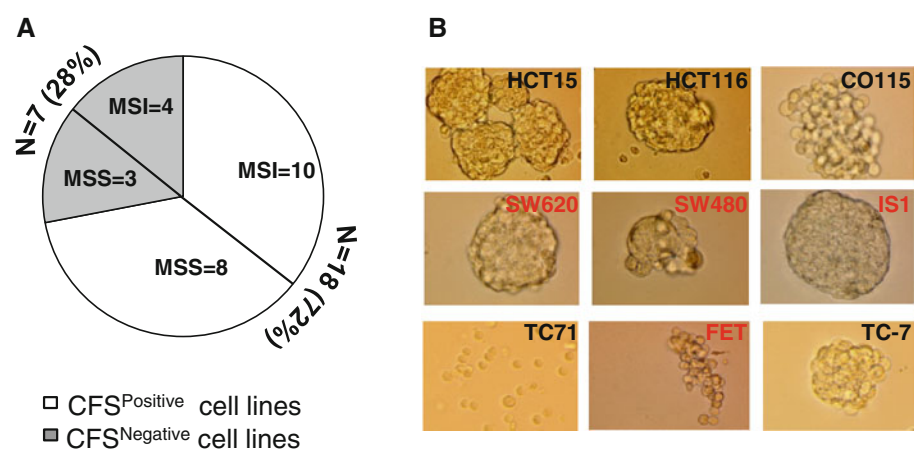
Extensive analysis using SNP microarrays revealed that genomic alterations due to chromosomal instability (CIN)

were similar between parental CRC cell lines and their related CFS. This was observed both with MSI and MSS CRC cell lines displaying low and high levels of CIN, respectively. SNP analysis was performed on 13 CFS/adherent cell lines (LIM2405, HCT8, HCT116, HCT15, TC-7 CO115, RKO, LS411, V9P, HT29, SW620, Colo320) (Fig. 2a; and data not shown). The status of DNA microsatellites that constitute accurate markers of the ‘history’ of each tumor cell in CRC cell lines displaying MSI was also analyzed. Mutation analysis of DNA microsatellite sequences in 10 CFS^{Positive} MSI cell lines (HCT116, CO115, HCT15, HCT8, ISHI, LIM2405, LS411, RKO, TC-7, TC71) revealed identical patterns of alteration in non-coding (*BAT26*, *BAT25*, *NR21*, *NR25*, *NR27*) and coding (*TGFB2*, *RAD50*, *MSH6*, *MSH3*, *MBD4*, *BAX*, *ATR*, *BLM*) repeats between parental cells and their corresponding CFS (Fig. 2b). Thus, CRC cell lines and their corresponding CFS progeny are clonally identical, indicating the CFS phenotype arises from the selection of pre-existing clones in the parental cell lines that are able to grow under specific conditions of serum deprivation.

Acquisition of the CFS phenotype by CRC cells is associated with specific changes in gene expression

The gene expression profiles of 13 CFS^{Positive} CRC cell lines (8 MSI: LIM2405, HCT8, HCT116, HCT15, TC-7 CO115, RKO, LS411; 5 MSS: V9P, HT29, SW620, Colo320, FET) and their corresponding CFS populations were compared using microarrays. Principal component analysis of the profiles revealed the CFS grouped together with their parental CRC cell lines (Supplementary Fig. S1A). A total of 264 genes displayed significant down- or up-regulation in CFS (P value <0.001 , paired moderated t test) and are listed in Supplementary Table S1. Specific signaling and metabolic pathways were associated with the CFS^{Positive} gene expression signature (Table 1). As

Fig. 1 **a** Results of the CFS assay in 25 CRC cell lines (MSS = 11; MSI = 14). **b** Morphological features of CFS from 9 CRC cell lines (MSI black, MSS red) grown in sphere-medium. The morphology of CFS derived from T71 is peculiar and these grow in suspension as single cells



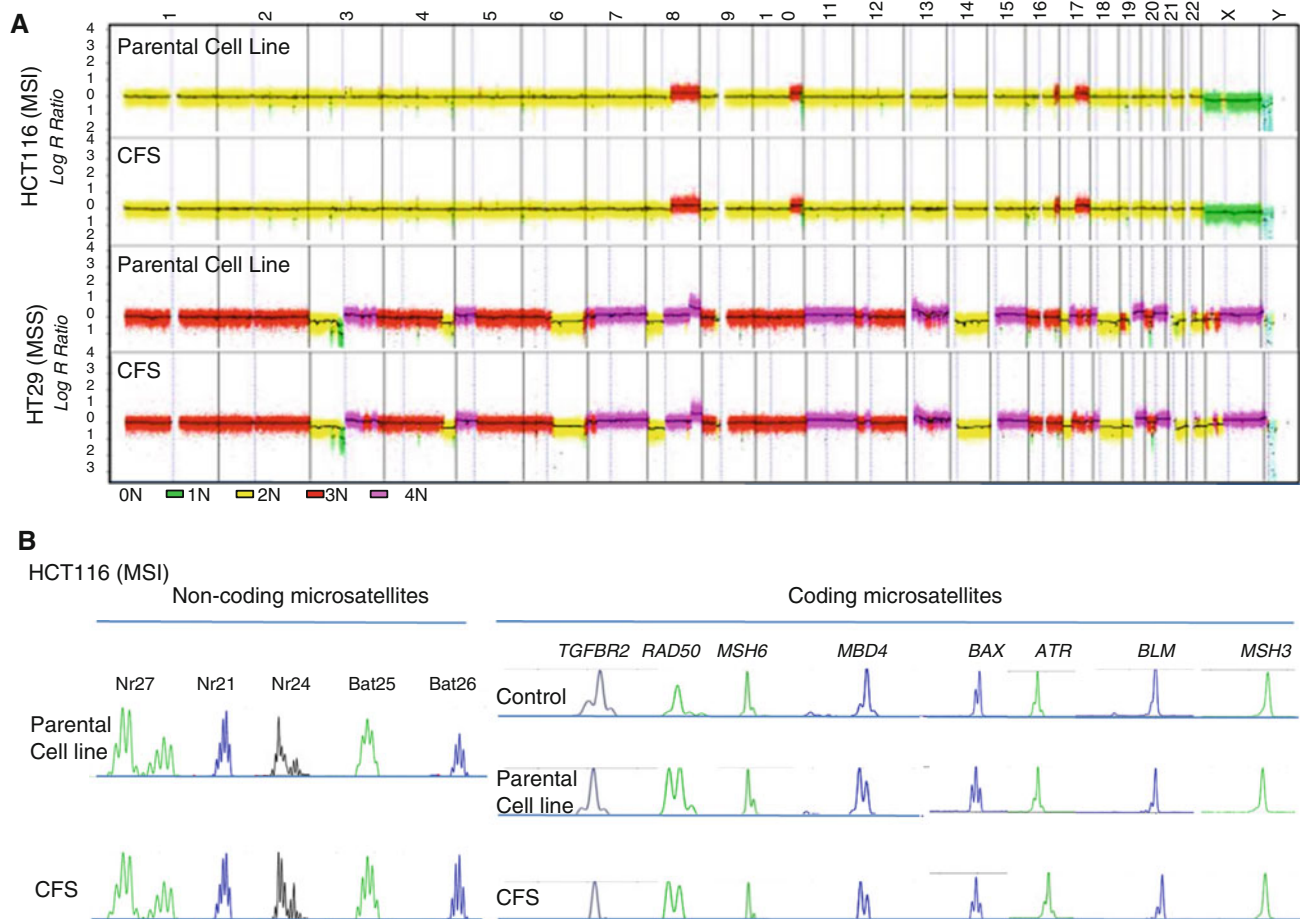


Fig. 2 a Extensive microarray analysis revealed that chromosomal aberrations due to CIN were similar between 13 parental CRC cell lines (LIM2405, HCT8, HCT116, HCT15, TC-7, CO115, RKO, LS411, V9P, HT29, SW620, Colo320, FET) and their corresponding CFS. Examples of chromosomal instability in HCT116 (MSI cell line), HT29 (MSS cell line) and their corresponding CFS. **b** Microsatellite instability in HCT116 parental cells and their corresponding

CFS. Mutation analysis of DNA microsatellites showed identical patterns of alteration in both non-coding (BAT26, BAT25, NR21, NR25, NR27) and coding (*TGFB2*, *RAD50*, *MSH6*, *MSH3*, *MBD4*, *BAX*, *ATR*, *BLM*) repeats in the parental CRC cell lines and their corresponding CFS. This was observed in HCT116 and in 10 CFS^{Positive} MSI CRC cell lines (HCT116, CO115, HCT15, HCT8, ISHI, LIM2405, LS411, RKO, TC-7, TC71, not shown)

expected, a number of genes from this signature reflected the different culture conditions used for adherent and CFS cells and were linked mainly to cell metabolism and growth factor pathways (Table 1). The CFS signature also included genes related to stemness and to cellular mechanisms associated with treatment resistance, such as transmembrane transporters, apoptosis and DNA damage (Table 1). Specific chromosomal regions were enriched with genes from the CFS signature (Supplementary Fig. S1B). These regions displayed a similar genomic status (DNA copy-number) in CFS and the parental CRC cell line, suggesting that gene deregulation occurred via epigenetic processes that were independent of DNA copy number. Regions that were frequently down or up-regulated in CFS (>30 %) are shown in the lower panel of Figure S1B.

Both CFS and their parental CRC cell lines are highly tumorigenic and they show similar expression of CSC markers

Serial engraftments of 8 CRC cell lines (5 CFS^{Positive}: HCT15, HCT116, LoVo, V9P, RKO; 3 CFS^{Negative}: LS174T, LIM1215, KM12) were performed in nude mice. All 8 cell lines tested were found to be highly tumorigenic, even when only 200 CRC cells were injected (Fig. 3a). CFS cells derived from HCT116 and LoVo cell lines were also highly tumorigenic. Low numbers of injected CFS cells (200 or 500 cells) derived from both these MSI CRC cell lines were less tumorigenic compared to the parental cell lines (Fig. 3b; and data not shown). However, no difference was apparent when 1000 cells were injected. The expression of

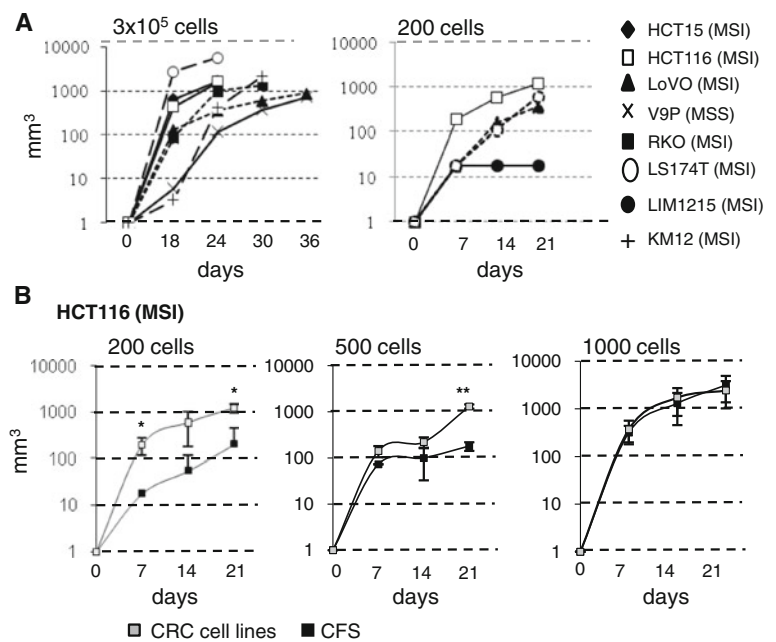
Table 1 Specific signaling and metabolic pathways significantly associated with the CFS gene signature

	Category	Subcategory	Src	Gene Sets	P value up	P value down
Significant KEGG pathways	Metabolism	Overview	KEGG	Biosynthesis of steroids	2.6E-27	-
		Metabolism of Terpenoids and Polyketides	KEGG	Terpenoid biosynthesis	1.3E-07	-
		Energy Metabolism	KEGG	Reductive carboxylate cycle (CO2 fixation)	2.4E-04	-
		Lipid Metabolism	KEGG	Fatty acid biosynthesis	1.4E-03	-
			KEGG	Synthesis and degradation of ketone bodies	3.3E-03	-
			KEGG	Glycerolipid metabolism	3.4E-03	-
			KEGG	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	4.3E-03	-
			KEGG	Fatty acid metabolism	9.6E-03	-
			KEGG	Glycerophospholipid metabolism	2.7E-02	-
		Carbohydrate Metabolism	KEGG	Propanoate metabolism	5.6E-03	-
			KEGG	Pyruvate metabolism	8.6E-03	-
			KEGG	Citrate cycle (TCA cycle)	3.4E-02	-
		Amino Acid Metabolism	KEGG	Valine, leucine and isoleucine degradation	1.0E-02	-
		Glycan Biosynthesis and Metabolism	KEGG	Glycosaminoglycan degradation	1.2E-02	-
			KEGG	Other glycan degradation	1.0E-03	-
		Metabolism of Other Amino Acids	KEGG	Glutathione metabolism	3.9E-02	-
	Organismal Systems	Endocrine System	KEGG	Adipocytokine signaling pathway	4.0E-03	-
	Environmental Information Processing	Signal Transduction	KEGG	PPAR signaling pathway	2.9E-02	-
			KEGG	MAPK signaling pathway	1.6E-02	-
	Genetic Information Processing	Folding, Sorting and Degradation	KEGG	Proteasome	-	4.3E-04
			KEGG	Ubiquitin mediated proteolysis	-	1.2E-04
		Replication and Repair	KEGG	DNA replication	-	1.0E-04
			KEGG	Mismatch repair	-	4.5E-04
Stem Cell Targeted Gene Sets	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	KEGG	Glycolysis / Gluconeogenesis	-	7.3E-04
			KEGG	Pyrimidine metabolism	-	3.6E-02
		Nucleotide Metabolism	KEGG	Pyrimidine metabolism	-	3.6E-02
			KEGG	Pyrimidine metabolism	-	3.6E-02
		Cellular Processes	KEGG	Cell cycle	-	1.1E-02
			KEGG	Hedgehog signaling pathway	-	2.7E-02
		Environmental Information Processing	KEGG	TGF-beta signaling pathway	-	4.0E-02
			KEGG	TGF-beta signaling pathway	-	4.0E-02
	Stem Cell Targeted Gene Sets	Stem Cell	MSigDB	BHATTACHARYA_EMBRYONIC_STEM_CELL (C2)	3.5E-02	-
			MSigDB	JAATINEN_HEMATOPOIETIC_STEM_CELL_UP (C2)	4.4E-02	-
			MSigDB	WONG_EMBRYONIC_STEM_CELL_CORE (C2)	-	4.3E-03
			MSigDB	OSWALD_HEMATOPOIETIC_STEM_CELL_IN_COLLAGEN_GEL_DN (C2)	-	7.4E-04
			MSigDB	BYSTRYKH_HEMATOPOIESIS_STEM_CELL_QTL_TRANS (C2)	-	1.9E-04
			MSigDB	LIANG_HEMATOPOIESIS_STEM_CELL_NUMBER_QTL (C2)	-	1.2E-02
			MSigDB	GAL_LEUKEMIC_STEM_CELL_DN (C2)	-	4.2E-02
			MSigDB	LIANG_HEMATOPOIESIS_STEM_CELL_NUMBER_LARGE_VS_TINY_DN (C2)	-	4.4E-02
		Drug Resistance	MSigDB	CREIGHTON_ENDOCRINE_THERAPY_RESISTANCE_3 (C2)	7.3E-09	-
			MSigDB	MASSARWEH_TAMOXIFEN_RESISTANCE_UP (C2)	2.9E-07	-
			MSigDB	KANG_CISPLATIN_RESISTANCE_UP (C2)	1.5E-03	-
			MSigDB	KANG_CISPLATIN_RESISTANCE_UP (C2)	1.5E-03	-
			GO	drug transporter activity	0.2E-03	-
			MSigDB	WHITESIDE_CISPLATIN_RESISTANCE_UP (C2)	1.3E-02	-
			MSigDB	CREIGHTON_ENDOCRINE_THERAPY_RESISTANCE_5 (C2)	1.3E-02	-
			MSigDB	WHITESIDE_CISPLATIN_RESISTANCE_UP (C2)	1.3E-02	-
			MSigDB	RIGGINS_TAMOXIFEN_RESISTANCE_UP (C2)	2.6E-02	-
			GO	GO RESPONSE TO DRUG (C5)	4.4E-02	-
		Cell cycle	GO	cell cycle	-	1.7E-11
			GO	mitotic cell cycle	-	1.3E-08
			GO	cell cycle process	-	1.3E-08
			GO	positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	-	1.3E-07
			GO	negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	-	1.7E-04
			SMD	cancerModules Cell cycle (expression clusters)	-	1.4E-03
			Bioc	Cyclins and Cell Cycle Regulation	-	3.0E-03
			KEGG	Cell cycle	-	1.1E-02
			Bioc	Cell Cycle: G1/S Check Point	-	1.5E-02
			Bioc	Regulation of p27 Phosphorylation during Cell Cycle Progression	-	1.6E-02
		Treatment Resistance	GO	M phase of mitotic cell cycle	-	2.1E-02
			GO	S phase of mitotic cell cycle	-	2.1E-02
			GO	interphase of mitotic cell cycle	-	2.3E-02
			Bioc	Ubiquitylation in the Control of Cell Cycle	-	4.8E-02
			GO	regulation of cell cycle	-	5.0E-02
		Transporter	MSigDB	GO TRANSITION_METAL_ION_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY (C2)	7.0E-03	-
			GO	drug transporter activity	9.2E-03	-
			MSigDB	GO LIPID_TRANSPORTER_ACTIVITY (C5)	2.8E-02	-
			MSigDB	GO DI_TRI VALENT_INORGANIC_CATION_TRANSMEMBRANE_TRANSPORT (C2)	3.3E-02	-
			MSigDB	REACTOME_METAL_ION_SLC_TRANSPORTERS (C2)	3.5E-02	-
			MSigDB	REACTOME_GLUCOSE_AND_OTHER_SUGAR_SLC_TRANSPORTERS (C2)	4.4E-02	-
		Apoptosis	GO	phosphatidylinositol transporter activity	4.8E-02	-
			GO	secondary active monocarboxylate transmembrane transporter activity	4.8E-02	-
			MSigDB	CONCANNON_APOPTOSIS_BY_EPOXOMICIN_UP (C2)	1.4E-03	-
			MSigDB	BROCKE_APOPTOSIS_REVERSED_BY_IL6 (C2)	2.4E-03	-
			MSigDB	GO ANTI_APOPTOSIS (C5)	2.6E-02	-
			MSigDB	GO REGULATION_OF_APOPTOSIS (C5)	4.3E-02	-
		DNA Damage	MSigDB	REACTOME_APOPTOSIS (C2)	-	4.3E-03
			MSigDB	REACTOME_APOPTOSIS_INDUCED_DNA_FRAGMENTATION (C2)	-	1.2E-02
			MSigDB	CONCANNON_APOPTOSIS_BY_EPOXOMICIN_DN (C2)	-	1.3E-02
			MSigDB	DEBIASI_APOPTOSIS_BY_REOVIRUS_INFECTION_DN (C2)	-	1.7E-02
			MSigDB	REACTOME_P53_INDEPENDENT_DNA_DAMAGE_RESPONSE (C2)	-	1.3E-02
			GO	response to DNA damage stimulus	-	1.1E-03
			SMD	cancerModules DNA damage response	-	1.2E-02
			MSigDB	KYNG_DNA_DAMAGE_BY_4NQO (C2)	1.3E-02	3.0E-02

P value up (down): hypergeometric test P value using top up (down) regulated genes in CFS versus cell line

Bioc biocarta, GO geneontology, MSigDB molecular signatures database, SMD stanford microarray database, KEGG kyoto encyclopedia of genes and genomes, C2 MSigDB curated gene sets, C5 MSigDB GO gene sets

Fig. 3 **a** Analysis of tumor growth following injection of a high number ($n = 3 \times 10^5$) of cells from CRC cell lines (5 CFS^{positive} and 3 CFS^{negative}, *left top panel*) or low number ($n = 200$) of cells (2 CFS^{positive} and 2 CFS^{negative}, *right top panel*). **b** Comparison of tumor growth following injection of CRC cell line HCT116 and the corresponding CFS at 200 cells ($*P = 0.034$ at 7 days and $P = 0.012$ at 21 days), 500 cells ($**P = 0.006$ at 21 days) and 1,000 cells



putative colorectal CSC markers (CD44, CD133, CD166, CD24, CD29, EPCAM, ALDH, OLFM4, LGR5) evaluated using arrays was not significantly different between 13 pairs of CFS cells and their corresponding parental cell lines (8 MSI: LIM2405, HCT8, HCT116, HCT15, TC-7 CO115, RKO, LS411; 5 MSS: V9P, HT29, SW620, Colo320, FET) (Fig. 4a). The expression of 6 putative colorectal CSC markers (CD44, CD166, CD133, CD24, EPCAM, CD29) was also compared using flow cytometry in the 25 parental CRC cell lines (Supplementary Table S2). Overall, the expression of these markers was highly variable and none was expressed exclusively in CFS^{positive} cell lines. Moreover, their expression was highly variable over time, as shown for CD44 and CD166 expression in cell sub-populations sorted by FACS from LS174T and HCT116 parental cells (Fig. 4b). Finally, we quantified the expression of putative colorectal CSC markers (CD44, CD133, CD166, CD24, CD29, EPCAM) in 15 primary CRCs and 12 CRC tumor xenografts established from these primary CRCs and grown in nude mice. Most markers were expressed at significantly higher levels in CRC cell lines compared to primary CRCs and/or tumor xenografts (Fig. 4c). Overall, these results demonstrate that the CFS phenotype derived from CRC cell lines is only weakly related to the putative CSC phenotype from primary tumors. In line with this, a CFS assay showed similar results using sorted populations of CD166⁺CD44⁺EPCAM^{high} or CD166⁻CD44⁻EPCAM^{low} HCT116 cells (Fig. 4d).

The ability of CRC cells to grow as CFS is strongly increased by prior treatment with 5-Fluorouracil

The ability of LoVo and HCT116 cell lines to grow as CFS in sphere-medium increased following treatment with the chemotherapeutic agent 5-Fluorouracil (5-FU) for 5 days at IC₁₀ % (5 μ M for HCT116 and 7.5 μ M for LoVo cells) (Fig. 5a, b; and data not shown). In contrast, 5-FU-resistant clones from the LIM1215 and LS174T CFS^{Negative} cell lines remained unable to grow in sphere-medium after 5-FU treatment at IC₁₀ (Fig. 5a). CRC cell lines were also compared to their CFS counterparts for resistance to 5-FU. In 6 CRC cell lines tested (FET, HCT116, LS411, V9P, TC71, LIM2405), the CFS displayed greater resistance to 5-FU than their parental cells (Fig. 5c). Both CFS^{Positive} and CFS^{Negative} CRC cell lines displayed marked differences in resistance to this drug (data not shown). LIM2405 showed a strong predilection to grow as CFS in sphere-medium (data not shown), yet the adherent cells and CFS showed similar resistance to 5-FU (Fig. 5c, bottom and right panels).

CFS established from CRC cell lines share a gene signature that predicts disease relapse in CRC patients

Fifty-five genes that were differentially expressed between CFS and their corresponding CRC cell lines displayed a high level of up- or down-regulation (log₂-fold change for CFS/parental cell line >0.8; Supplementary Table S1; Fig. 6). This 55-gene CFS expression signature predicted

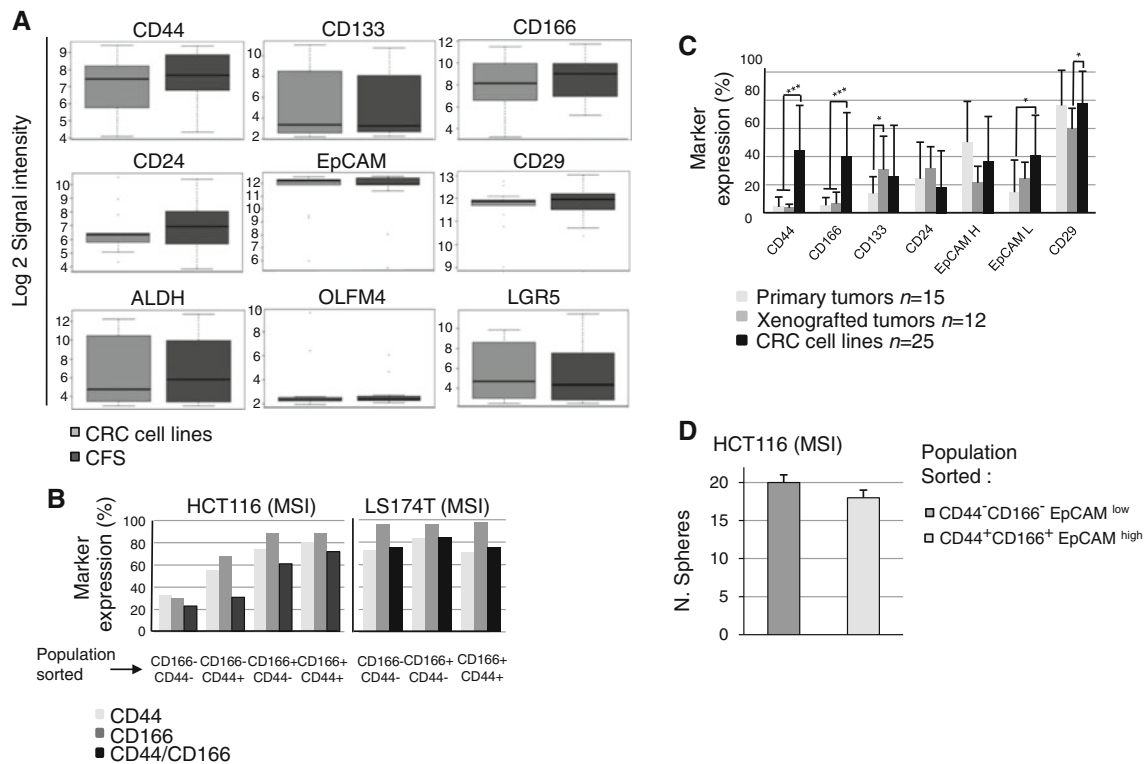


Fig. 4 **a** Expression of putative colorectal CSC markers (CD44, CD133, CD166, CD24, CD29, EPCAM, ALDH, OLFM4, LGR5) were investigated using gene expression arrays in 13 CFS/parental cell lines (8 MSI: LIM2405, HCT8, HCT116, HCT15, TC-7 CO115, RKO, LS411; 5 MSS: V9P, HT29, SW620, Colo320, FET). **b** Expression of CD166 and CD44 markers was investigated by flow cytometry in different subpopulations of sorted cells from the HCT116 and LS174T parental cells. CD166⁻/CD44⁻, CD166⁺/CD44⁻, CD166⁺/CD44⁺ and CD166⁻/CD44⁺ (HCT116 only) cells

were sorted by FACS and re-inoculated in medium. After a few days of growth, cells from sorted subpopulations were analyzed again for marker expression. The CD expression pattern was compared to the cell sorted profile. **c** Expression of six markers in CRC cell lines ($n = 25$), primary CRCs ($n = 15$) and/or tumor xenografts established directly from the primary CRC ($n = 12$). **d** CFS ability of HCT116 after sorting of two subpopulations of CD166⁺CD44⁺ EpCAM^{high} and CD166⁻CD44⁻ EpCAM^{low} cells

disease relapse in a previously described, retrospective series of stage II and III CRC patients [25]. Tumors were classified into two groups according to the expression level of the 55 genes (T-CFS^{High} or T-CFS^{Low}; for further details, see “Materials and methods” and Fig. 6a), where T-CFS^{High} and T-CFS^{Low} correspond to tumors displaying high or low levels of expression of the CFS signature, respectively. Patients with T-CFS^{High} tumors showed significantly shorter disease-free survival (DFS) compared to T-CFS^{Low} patients (Supplementary Figure S3A, bottom and left panel). To confirm these clinical findings, the same analysis was performed on another, independent cohort of stage II and III CRC patients [26]. A trend for similar clinical impact of the 55-gene CFS expression signature was observed (Supplementary Figure S2A, bottom and right panel). Following normalization of the data, the two patient series were combined to achieve greater statistical power. In the overall series and in univariate analysis, the survival of stage II and III CRC patients was associated with the expression level of the 55-gene CFS signature

(Fig. 7, left panel; Supplementary Figure S2A, top and left panel).

Since the 55-gene signature showed a trend for association with patient outcome in the second dataset, we sought to identify a novel prognostic signature by selecting genes that were individually associated with outcome in the first dataset. This allowed us to define an 8-gene CFS prognostic signature (Fig. 6b; Supplementary Table S1) that showed stronger associations with disease relapse in both the individual and combined patient cohorts (Fig. 7, right panel; Supplementary Figure S2B, top and right panel). To ensure this finding was related to the CFS 55-gene selection and not to the methodology, the same approach was repeated 1,000 times using signatures from 55 genes selected at random. This analysis did not increase the false positive rate in the second dataset (data not shown). In the overall series and in multivariate Cox analysis that included TNM stage, the survival of patients with stage II or III CRC was confirmed to be associated with the expression level of 8 genes from the CFS signature (Table 2).

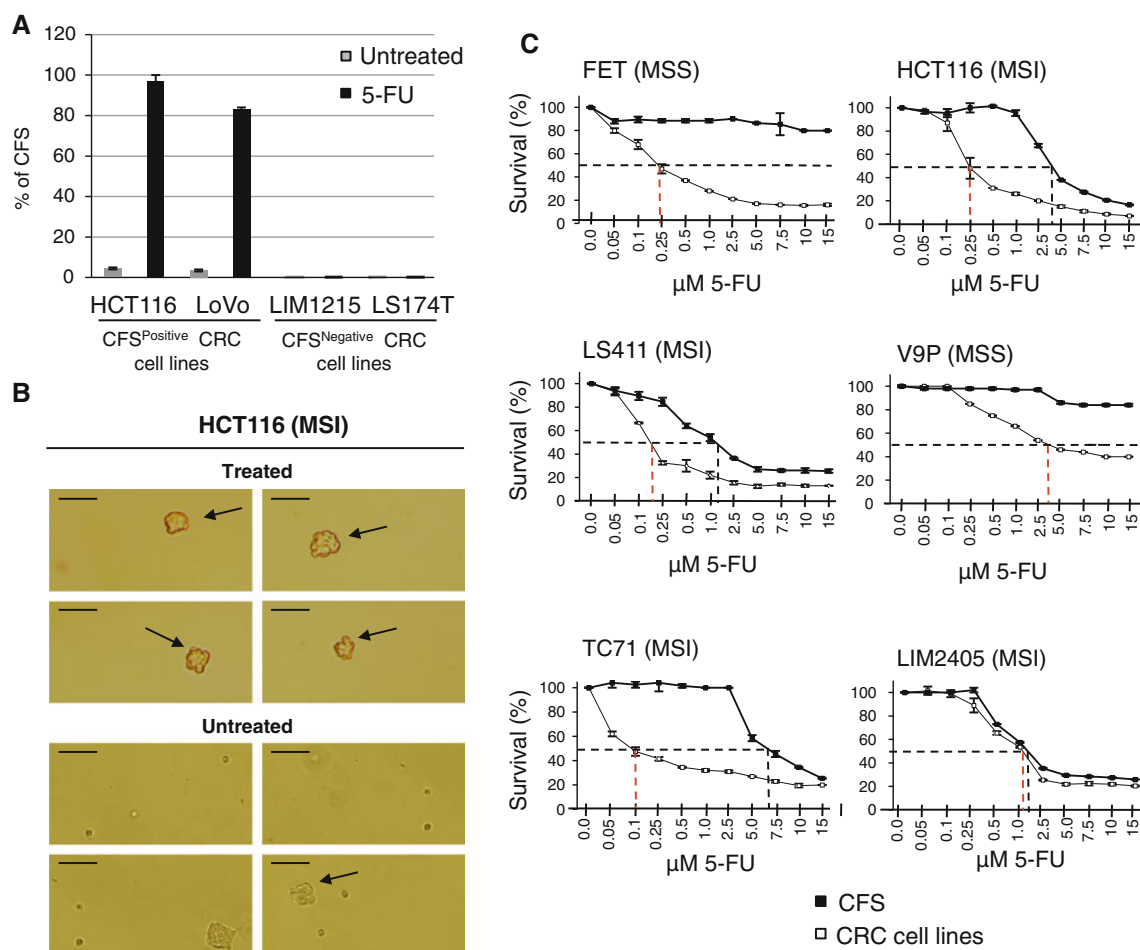


Fig. 5 **a** Percentage of CFS in sphere-medium from LoVo, HCT116, LIM1215 and LS174T cells before and after treatment with 5-Fluorouracil for 5 days at IC₁₀ % (7.5, 7.5, 5 and 20 μM, respectively). **b** Representative image of spheres (arrows) from HCT116 cells treated with 5-fluorouracil for 5 days at IC₁₀ % (top) and untreated

(bottom) after 3 days in sphere-medium (size bar 100 μm). **c** Cell survival curves for 6 CRC cell lines and their corresponding CFS following 5 days of exposure to increasing concentrations of 5-Fluorouracil. Dotted lines indicate the IC₅₀ value in each case

CFS can be used as models to identify new drugs that are more efficient at killing CFS than 5-fluorouracil

Because of the current clinical interest in CFS, the Institut Curie-CNRS chemical library (8,560 compounds) was screened using the HCT116 (MSI) and FET (MSS) CRC cell lines (Supplementary Fig. S3A). Fifteen new compounds were identified with the ability to kill both parental CRC cells and CFS from HCT116 and/or FET at low concentration (IC₅₀ % < 1 μM; Supplementary Fig. S3B). Of note, 8/15 (53 %) of these new compounds belong to the Nitrofurans' family previously reported to display anticancer and antioxidant properties (Supplementary Table S3, entries 1–8) [29, 30]. Since the library contains 240 of this class of compound (2.8 % of the total), Nitrofurans were significantly over-represented amongst the 15 drugs with high effectiveness against CFS ($P = 2.4 \times 10^{-9}$, Fisher's exact test). In contrast to results obtained

with 5-FU (see Fig. 5b), the ability of HCT116 and FET cell lines to grow in serum-free medium did not increase following treatment with three of the new compounds for 5 days at IC₁₀ % (Supplementary Fig. S3C).

Discussion

Not all CRC cell lines contain CFS. This result may reflect the true heterogeneity of CRC but may also be due to events that occurred in vitro during or after the establishment of CRC cell lines. All CRC cell lines tested here were highly tumorigenic in mouse xenograft assays. We did not observe increased tumorigenicity of CFS-positive compared to CFS-negative CRC cell lines, nor of CFS compared to their parental cell line counterpart. Surprisingly, at lower numbers of injected cells, CFS were less tumorigenic compared to their parental cell line. We have

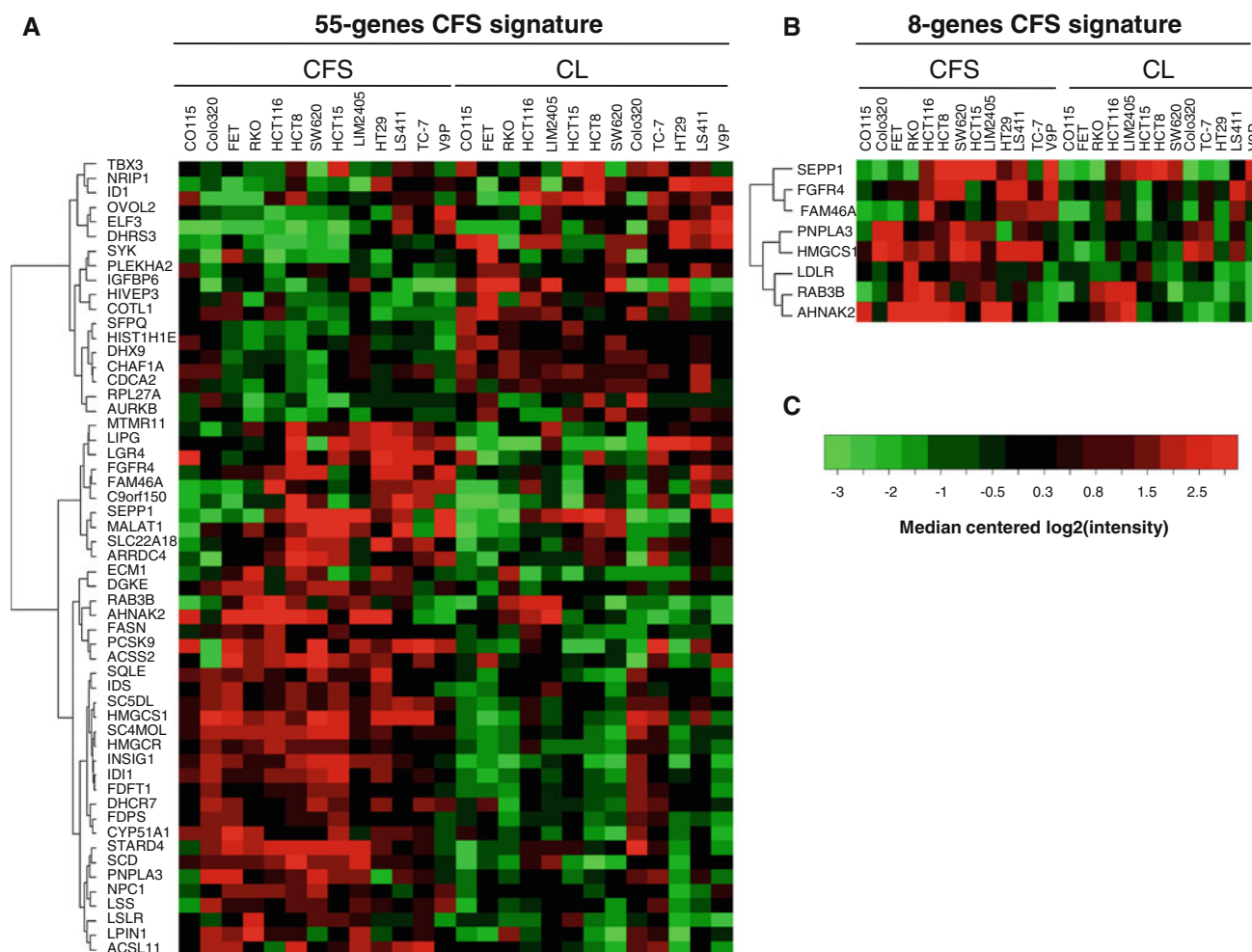
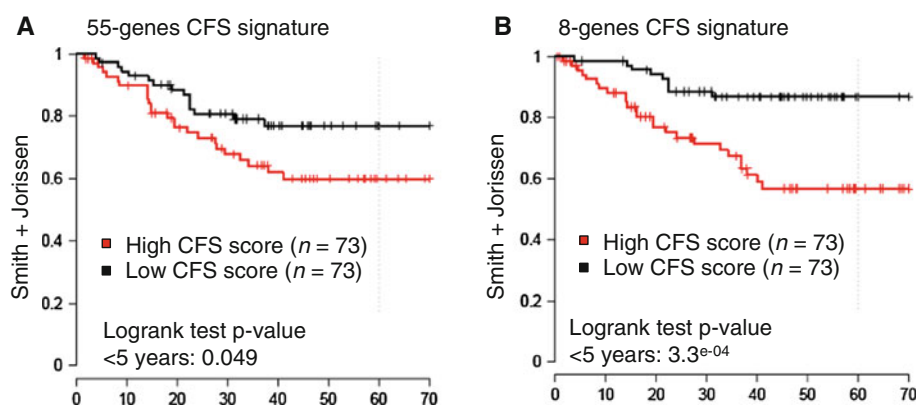


Fig. 6 Heatmaps of the 55-gene (a) and 8-gene signatures (b). Visualization of the expression level for each gene in each sample relative to the median gene intensity (c) across all samples. Green corresponds to down-regulation and red to up-regulation. CL parental CRC cell line

Fig. 7 Kaplan–Meier analysis of disease-free survival for CRC patients classified according to expression levels for the 55-gene (left panel) or 8-gene (right panel) CFS signature



no obvious explanation for this result. In any case, CRC cell lines are not ideal models for evaluating tumorigenicity because of their high level of heterogeneity. Compared to primary colorectal tumors, aberrant expression of putative CSC markers was observed in the CRC cell lines investigated here, but was not different to that of CFS, as already

reported for HCT116 [16]. Moreover, the current transcriptome analyses revealed only weak correlations between CFS and the expression of stem cell gene markers. These results highlight the fact that CSC markers are not specific for CFS. The CFS phenotype is therefore quite different to that of putative CSCs from primary tumors. It

Table 2 Association of the 8-gene CFS high/low score and TNM stage and prognosis in the combined dataset (Smith + Jorissen)

		Chi ² test <i>P</i> value		CFS ^{High} (<i>n</i> = 73)		CFS ^{Low} (<i>n</i> = 73)					
TNM Stage	2 (<i>n</i> = 82)	0.097		35 (49 %)		46 (63 %)					
	3 (<i>n</i> = 65)			38 (51 %)		27 (37 %)					
				Cox univariate analysis				Cox multivariate analysis			
	Annotation	Value ^a	<i>n</i> samples	<i>n</i> events	H.R.	95 % C.I.	<i>P</i> value	H.R.	95 % C.I.	<i>P</i> value	Model <i>P</i> value
Jorissen + Smith 8-genes signature	TNM stage	3	145	34	2.1	1–4.2	0.037	1.8	0.88–3.5	0.11	4.10E−04
	SC score	CFS ^{Low}	145	34	0.27	0.13–0.58	8.0E−04	0.29	0.14–0.64	1.8E−03	

The clinical and molecular heterogeneity of CRC is a major limitation of this type of study. Principal component analyses of the transcriptomic profiles showed that considerable heterogeneity remains between CFS displaying MSI or MSS. The response to chemotherapy is thought to be different between patients with MSI and MSS colon tumors, even when considering tumors with the same stage of disease [37]. The CFS gene signature identified here was shared by both MSI and MSS CRC. Nevertheless, we could not evaluate the clinical relevance of MSI-specific or MSS-specific CFS signatures for patients with these tumor subgroups because MSI status is not contained in the publicly available Affymetrix U133P2 datasets with Recurrence Free Survival annotations used for this study. This is a subject for future investigation.

In conclusion, the current findings support the existence of CFS subpopulations within CRC cell lines and provide a framework to explain the origin of these tumor cells. They also suggest that CRC cells acquire the CFS phenotype through mechanisms that are only weakly related to CSC, but which could nevertheless be important for the development of chemoresistance by CRC cells in vivo in primary tumors. The screening of 8,560 potential anticancer agents using an assay involving CFS populations derived from CRC cell lines may therefore be a useful approach to identify novel drugs for clinical application. The 15 new drugs identified in this study, including several new compounds belonging to the Nitrofurans' family, are currently being tested for toxicity and efficacy in pre-clinical studies using animal models.

Acknowledgments This work was supported by the 'Carte d'Identité des Tumeurs' (CIT) program (<http://cit.ligue-cancer.net>) from the Ligue Nationale Contre le Cancer and by grants from the 'Institut National du Cancer' (INCa) (to A.D.). The A.D. group has the label "La Ligue Contre le Cancer". A.C. is a recipient of an INCa fellowship (Institut National du Cancer). A.L. is a recipient of a MESR fellowship (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche).

Conflict of interest No potential conflicts of interests were disclosed.

References

1. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G, Medema JP, Stassi G (2007) Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 1(4):389–402. doi:[10.1016/j.stem.2007.08.001](https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.001)
2. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445(7123):106–110. doi:[10.1038/nature05372](https://doi.org/10.1038/nature05372)
3. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445(7123):111–115. doi:[10.1038/nature05384](https://doi.org/10.1038/nature05384)
4. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414(6859):105–111. doi:[10.1038/3510216735102167](https://doi.org/10.1038/3510216735102167)
5. Dean M, Fojo T, Bates S (2005) Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5(4):275–284. doi:[10.1038/nrc1590](https://doi.org/10.1038/nrc1590)
6. Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, van Galen P, Metzeler KH, Poepl A, Ling V, Beyene J, Canty AJ, Danska JS, Bohlander SK, Buske C, Minden MD, Golub TR, Jurisica I, Ebert BL, Dick JE (2011) Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med* 17(9):1086–1093. doi:[10.1038/nm.2415](https://doi.org/10.1038/nm.2415)
7. Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, Clarke MF (2004) Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 14(1):43–47. doi:[10.1016/j.gde.2003.11.007](https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.11.007)
8. Medema JP, Vermeulen L (2011) Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* 474(7351):318–326. doi:[10.1038/nature10212](https://doi.org/10.1038/nature10212)
9. Liu Y, Bodmer WF (2006) Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(4):976–981. doi:[10.1073/pnas.0510146103](https://doi.org/10.1073/pnas.0510146103)
10. Volchenboum SL, Li C, Li S, Attiyeh EF, Reynolds CP, Maris JM, Look AT, George RE (2009) Comparison of primary neuroblastoma tumors and derivative early-passage cell lines using genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer Res* 69(10):4143–4149. doi:[10.1158/0008-5472.CAN-08-3112](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3112)
11. Douglas EJ, Fiegler H, Rowan A, Halford S, Bicknell DC, Bodmer W, Tomlinson IP, Carter NP (2004) Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer Res* 64(14):4817–4825. doi:[10.1158/0008-5472](https://doi.org/10.1158/0008-5472)
12. Willson JK, Bittner GN, Oberley TD, Meisner LF, Weese JL (1987) Cell culture of human colon adenomas and carcinomas. *Cancer Res* 47(10):2704–2713
13. Kondo T (2007) Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines. *Cancer Biomark* 3(4–5):245–250
14. Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF (2010) Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(8):3722–3727. doi:[10.1073/pnas.0915135107](https://doi.org/10.1073/pnas.0915135107)
15. Dittfeld C, Dietrich A, Peickert S, Hering S, Baumann M, Grade M, Ried T, Kunz-Schughart LA (2009) CD133 expression is not selective for tumor-initiating or radioresistant cell populations in the CRC cell lines HCT-116. *Radiother Oncol* 92(3):353–361. doi:[10.1016/j.radonc.2009.06.034](https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.06.034)
16. Kai K, Nagano O, Sugihara E, Arima Y, Sampetean O, Ishimoto T, Nakanishi M, Ueno NT, Iwase H, Saya H (2009) Maintenance of HCT116 colon cancer cell line conforms to a stochastic model but not a cancer stem cell model. *Cancer Sci* 100(12):2275–2282. doi:[10.1111/j.1349-7006.2009.01318.x](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01318.x)
17. Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255(5052):1707–1710
18. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF (2007) The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:675–699. doi:[10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154](https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154)
19. Fan X, Ouyang N, Teng H, Yao H (2011) Isolation and characterization of spheroid cells from the HT29 colon cancer cell line. *Int J Colorectal Dis* 26(10):1279–1285. doi:[10.1007/s00384-011-1248-y](https://doi.org/10.1007/s00384-011-1248-y)
20. Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, Perez Alea M, Richel DJ, Stassi G, Medema JP (2008) Single-

- cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(36):13427–13432. doi:[10.1073/pnas.0805706105](https://doi.org/10.1073/pnas.0805706105)
21. Jung P, Sato T, Merlos-Suarez A, Barriga FM, Iglesias M, Rossell D, Auer H, Gallardo M, Blasco MA, Sancho E, Clevers H, Batlle E (2011) Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med* 17(10):1225–1227. doi:[10.1038/nm.2470](https://doi.org/10.1038/nm.2470)
 22. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386(6625):623–627. doi:[10.1038/386623a0](https://doi.org/10.1038/386623a0)
 23. Duval A, Hamelin R (2002) Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 62(9):2447–2454
 24. Pino MS, Chung DC (2010) The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 138(6):2059–2072. doi:[10.1053/j.gastro.2009.12.065](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065)
 25. Smith JJ, Deane NG, Wu F, Merchant NB, Zhang B, Jiang A, Lu P, Johnson JC, Schmidt C, Bailey CE, Eschrich S, Kis C, Levy S, Washington MK, Heslin MJ, Coffey RJ, Yeatman TJ, Shyr Y, Beauchamp RD (2010) Experimentally derived metastasis gene expression profile predicts recurrence and death in patients with colon cancer. *Gastroenterology* 138(3):958–968. doi:[10.1053/j.gastro.2009.11.005](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.11.005)
 26. Jorissen RN, Gibbs P, Christie M, Prakash S, Lipton L, Desai J, Kerr D, Aaltonen LA, Arango D, Kruhoffer M, Orntoft TF, Andersen CL, Gruidl M, Kamath VP, Eschrich S, Yeatman TJ, Sieber OM (2009) Metastasis-associated gene expression changes predict poor outcomes in patients with Dukes stage B and C colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 15(24):7642–7651. doi:[10.1158/1078-0432.CCR-09-1431](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1431)
 27. Spinola M, Leoni V, Pignatiello C, Conti B, Ravagnani F, Pastorino U, Dragani TA (2005) Functional FGFR4 Gly388Arg polymorphism predicts prognosis in lung adenocarcinoma patients. *J Clin Oncol* 23(29):7307–7311. doi:[10.1200/JCO.2005.17.350](https://doi.org/10.1200/JCO.2005.17.350)
 28. Kang HC, Kim IJ, Park JH, Shin Y, Ku JL, Jung MS, Yoo BC, Kim HK, Park JG (2004) Identification of genes with differential expression in acquired drug-resistant gastric cancer cells using high-density oligonucleotide microarrays. *Clin Cancer Res* 10(1 Pt 1):272–284
 29. Hayakawa I, Shioya R, Agatsuma T, Furukawa H, Sugano Y (2004) Thienopyridine and benzofuran derivatives as potent anti-tumor agents possessing different structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem Lett* 14(13):3411–3414. doi:[10.1016/j.bmcl.2004.04.079](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.04.079)
 30. Baraldi PG, Romagnoli R, Giovanna Pavani M, del Carmen Nunez M, Bingham JP, Hartley JA (2002) Benzoyl and cinnamoyl nitrogen mustard derivatives of benzoheterocyclic analogues of the tallimustine: synthesis and antitumour activity. *Bioorg Med Chem* 10(5):1611–1618
 31. Gottesman MM (2002) Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 53:615–627. doi:[10.1146/annurev.med.53](https://doi.org/10.1146/annurev.med.53)
 32. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7(9):1028–1034. doi:[10.1038/nm0901-1028](https://doi.org/10.1038/nm0901-1028)
 33. Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, Nomiyama K, Hosokawa K, Sakurada K, Nakagata N, Ikeda Y, Mak TW, Suda T (2004) Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431(7011):997–1002. doi:[10.1038/nature02989](https://doi.org/10.1038/nature02989)
 34. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444(7120):756–760. doi:[10.1038/nature05236](https://doi.org/10.1038/nature05236)
 35. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke MF (2009) Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 458(7239):780–783. doi:[10.1038/nature07733](https://doi.org/10.1038/nature07733)
 36. Merlos-Suarez A, Barriga FM, Jung P, Iglesias M, Cespedes MV, Rossell D, Sevillano M, Hernando-Momblona X, da Silva-Diz V, Munoz P, Clevers H, Sancho E, Mangues R, Batlle E (2011) The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell* 8(5):511–524. doi:[10.1016/j.stem.2011.02.020](https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.02.020)
 37. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, Kim GP, Yothers G, Allegra C, Moore MJ, Gallinger S, Sargent DJ (2011) DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* 103(11):863–875. doi:[10.1093/jnci/djr153](https://doi.org/10.1093/jnci/djr153)
 38. Poupon MF, Arvelo F, Goguel AF, Bourgeois Y, Jacrot M, Hanania N, Arriagada R, Le Chevalier T (1993) Response of small-cell lung cancer xenografts to chemotherapy: multidrug resistance and direct clinical correlates. *J Natl Cancer Inst* 85(24):2023–2029
 39. Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A, Hamelin R (2004) Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers* 20(4–5):251–257
 40. Gayet J, Zhou XP, Duval A, Rolland S, Hoang JM, Cottu P, Hamelin R (2001) Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 20(36):5025–5032. doi:[10.1038/sj.onc.1204611](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204611)
 41. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31(4):e15
 42. Letouze E, Sow A, Petel F, Rosati R, Figueiredo BC, Burnichon N, Gimenez-Roqueplo AP, Lalli E, de Reynies A (2012) Identity by descent mapping of founder mutations in cancer using high-resolution tumor SNP data. *PLoS ONE* 7(5):e35897. doi:[10.1371/journal.pone.0035897](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035897)
 43. Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3:Article3. doi:[10.2202/1544-6115.1027](https://doi.org/10.2202/1544-6115.1027)